

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie  
Leitung: Professor Dr. Claus Franz Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und  
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Stamm- und geschlechtsspezifische Unterschiede der  
Lungenarchitektur sowie der Ultrastruktur der  
Alveolarsepten bei C3H/HeJ- und JF1/Msf-Mäusen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin,  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Dorothea Hühn

aus Gießen

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
01.10.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Professor Dr. Matthias Rothmund  
Referent: Professor Dr. Heinz Fehrenbach  
1. Korreferent: Professor Dr. Peter Barth

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis.....</u>	<u>I</u>
<u>Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>IV</u>
<u>Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>V</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis .....</u>	<u>VI</u>
<u>1. Einleitung .....</u>	<u>1</u>
1.1 Die Maus als Versuchstier im Labor .....	1
1.2 Die Inzucht-Stämme .....	2
1.2.1 C3H/HeJ – <i>Mus musculus domesticus</i> .....	3
1.2.2 JF1/Msf – <i>Mus musculus molossinus</i> .....	3
1.3 Die Maus in der pneumologischen Forschung .....	3
1.3.1 Unterschiede zwischen Inzucht-Stämmen .....	4
1.3.2 Unterschiede zwischen den Geschlechtern .....	5
1.3.3 C3H und JF1 – so unterschiedlich wie Maus und Maus.....	7
1.4 Der Aufbau des Gasaustauschbereichs der Lunge.....	9
1.4.1 Alveolarepithelzellen Typ I.....	10
1.4.2 Alveolarepithelzellen Typ II.....	11
1.4.3 Die Kapillaren und das Kapillarendothel .....	12
1.4.4 Das Interstitium .....	12
1.5 Der medizinische Hintergrund .....	14
<u>2. Zielsetzung der Arbeit .....</u>	<u>17</u>

<u>3. Material und Methoden.....</u>	<u>18</u>
3.1 Die Präparation .....	18
3.2 Die Aufarbeitung der Proben für die Lichtmikroskopie .....	19
3.2.1 Die Einbettung in Technovit.....	19
3.2.2. Färbungen.....	20
3.3. Aufarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie .....	21
3.3.1 Die Einbettung in Araldit .....	21
3.3.2 Anfertigung der Schnitte .....	22
3.4 Quantitative Strukturanalyse.....	22
3.4.1 Lichtmikroskopische Auswertung.....	23
3.4.2 Elektronenmikroskopische Auswertung .....	31
3.4.3 Berechnung der absoluten Volumina.....	31
3.5 Explorative statistische Datenauswertung .....	32
<u>4. Ergebnisse .....</u>	<u>33</u>
4.1 Allgemeines.....	33
4.2 Lichtmikroskopie.....	34
4.2.1 Das Lungenvolumen.....	35
4.2.2 Das Lungenparenchym .....	38
4.2.3 Der Luftraum .....	40
4.3 Oberflächendichte, Oberfläche und Dicke der Alveolarsepten .....	45
4.3.1 Alveolaroberflächendichte und Alveolaroberfläche .....	45
4.3.2 Arithmetische mittlere Dicke der Alveolarsepten.....	48
4.4 Elektronenmikroskopie .....	49
4.4.1 Das Alveolarseptum .....	50
<u>5. Diskussion.....</u>	<u>62</u>
5.1 Das Körpergewicht .....	62
5.2 Die Architektur der Lunge .....	64
5.2.1 Lungenvolumen.....	65
5.2.2 Das Parenchym.....	66
5.2.3 Der Luftraum .....	66
5.3 Die Zusammensetzung des Septums .....	73
5.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	77

Inhaltsverzeichnis .....	III
<u>6. Zusammenfassung.....</u>	<u>79</u>
<u>7. Summary.....</u>	<u>81</u>
<u>8. Literaturverzeichnis .....</u>	<u>83</u>
<u>Verzeichnis der akademischen Lehrer.....</u>	<u>i</u>
<u>Danksagung .....</u>	<u>ii</u>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Stammbaum der <i>Mus musculus</i> Sub-Species.....	2
Abbildung 2 Die Mäuse .....	7
Abbildung 3 Der respiratorische Trakt des Menschen .....	9
Abbildung 4 Der Gasaustauschbereich der Lunge .....	10
Abbildung 5 Elastische und kollagene Fasern im Alveolarseptum .....	13
Abbildung 6 Erstellung und Auswahl der Lungenschnitte .....	19
Abbildung 7 Kaskade der Probenentnahme .....	23
Abbildung 8 Auswertung von Parenchym/Nicht-Parenchym der Lungen an einem Richardson gefärbten Schnitt.....	27
Abbildung 9 Auswertung von Septengewebe, Luftraum- und Kapillarlumenvolumina der Lungen an einem Richardson gefärbten Schnitt .....	28
Abbildung 10 Bestimmung der Anteile von Ductuli und Alveolen am Luftraumvolumen an einem Orcein gefärbten Schnitt .....	29
Abbildung 11 Bestimmung von Oberflächendichte und Oberfläche des Alveolarepithels sowie Bestimmung der <i>Mean Face Length</i> an einem Orcein gefärbten Schnitt .....	30
Abbildung 12 Lichtmikroskopische Übersicht über das Parenchym der Lungen von C3H- und JF1-Mäusen .....	35
Abbildung 13 Das Lungenvolumen der C3H- und JF1-Mäuse .....	37
Abbildung 14 Das Volumen des Lungenparenchyms der C3H- und JF1-Mäuse.....	39
Abbildung 15 Das Luftraumvolumen der C3H- und JF1-Mäuse .....	42
Abbildung 16 Charakterisierung des Luftraumes der C3H- und JF1-Mäuse .....	44
Abbildung 17 Alveolaroberflächendichte der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	46
Abbildung 18 Die Alveolaroberfläche der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	47
Abbildung 19 Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht über Endknöpfchen in Lungen der Stämme C3H und JF1 .....	49
Abbildung 20 Transmissionselektronenmikroskopisches Bild eines Alveolarseptums .....	52
Abbildung 21 Das Septenvolumen (ohne elastische und kollagen Fasern) der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	53
Abbildung 22 Transmissionselektronenmikroskopisches Bild einer Alveolarepithelzelle Typ II .....	56
Abbildung 23 Die Volumina der elastischen und kollagenen Fasern der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	59
Abbildung 24 Transmissionselektronenmikroskopisches Bild von Endknöpfchen der Lunge einer männlichen JF1-Maus.....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Basisdaten zu den Mäusen der Stämme C3H und JF1 .....	34
Tabelle 2 Signifikanzen von Körpergewicht und Lungenvolumen der C3H- und JF1-Mäuse .....	34
Tabelle 3 Signifikanzen der Volumina von Parenchym und Nicht-Parenchym der C3H- und JF1-Mäuse .....	36
Tabelle 4 Die Volumina des Lungenparenchyms der C3H- und JF1-Mäuse .....	38
Tabelle 5 Die Signifikanzen der Volumina der Komponenten des Lungenparenchyms der C3H- und JF1-Mäuse .....	40
Tabelle 6 Das Luftraumvolumen, körperlengewichtsnormierte Angaben für die Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	41
Tabelle 7 Die Signifikanzen der Luftraumvolumina der C3H- und JF1-Mäuse .....	41
Tabelle 8 <i>Mean Face Length</i> der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	43
Tabelle 9 Signifikanzen von <i>Mean Face Length</i> und <i>Mean Chord Length</i> der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	43
Tabelle 10 Signifikanzen der Alveolaroberflächendichte der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	45
Tabelle 11 Signifikanzen der Alveolaroberfläche der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	48
Tabelle 12 Signifikanzen der arithmetischen mittleren Dicke der Alveolarsepten....	48
Tabelle 13 Volumendichte [%] der Bestandteile der Alveolarsepten der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	50
Tabelle 14 Gesamtvolumen [mm <sup>3</sup> ] der Bestandteile der Alveolarsepten pro Lunge	51
Tabelle 15 Signifikanzen der Volumina der Septumbestandteile pro Lunge .....	51
Tabelle 16 Gesamtvolumen [mm <sup>3</sup> /g] der Bestandteile der Alveolarsepten pro Lunge bezogen auf das Körpergewicht .....	54
Tabelle 17 Signifikanzen der Volumina der Septumbestandteile pro Lunge bezogen auf das Körpergewicht .....	55
Tabelle 18 Signifikanzen des Verhältnisses von Elastin/Kollagen der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse .....	58
Tabelle 19 Zusammenfassung der signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen und Geschlechtern .....	61
Tabelle 20 Vergleich des Körpergewichts und Lebensalters der Stämme in verschiedenen Studien .....	63



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin konvertierendes Enzym
Alv	Alveole
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
A <sub>p</sub>	<i>area per point</i> , Fläche pro Testpunkt
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata
B6	Mausstamm C57BL/6J
BM	Basalmembran
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CapLu	Kapillarlumen
C.A.S.T.	<i>Computer Assisted Stereological Toolbox</i>
C3H	Mausstamm C3H/HeJ
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
cm H <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
CO	Kohlenmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Col	Kollagen
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , Chronisch- obstruktive Lungenerkrankung
DC	Luftraum der <i>Ductus alveolares</i>
EK	Endknöpfchen
Ela	Elastin
Endo	Kapillarendothel
Epi I	Alveolarepithelzelle Typ I
Epi II	Alveolarepithelzelle Typ II
ER-α	Östrogenrezeptor alpha
ER-β	Östrogenrezeptor beta
ERV	Expiratorisches Reservevolumen
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter

FEV <sub>1</sub>	<i>Forced expiratory volume in one second</i> , forcierte expiratorische Einsekundenkapazität
Fib	Fibrozyt
FRC	<i>Funktional residual capacity</i> , funktionelle Residualkapazität
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor</i>
GSF	Gesellschaft für Strahlenforschung
h	<i>hour</i> , Stunde(n)
HEMA	Hydroxyethyl-Methacrylat
I	<i>Intersection</i> , Schnittpunkte einer Testlinie mit einer Oberfläche
I <sub>Par</sub>	Durchtritte von Testlinien durch Parenchymoberfläche
I <sub>Sept</sub>	Durchtritte von Testlinien durch Septenoberfläche
Inter	Interstitium
I/R	Ischämie/Reperfusionsschaden
IRC	<i>inspiratory reserve capacity</i> , inspiratorisches Reservevolumen
JF1	Mausstamm JF1/Msf
KG	Körpergewicht
LB	<i>Lamellar bodies</i> , Lamellarkörperchen
Lcm	<i>Mean Chord Length</i>
L <sub>p</sub>	<i>Length per point</i> , Testlinienlänge pro Punkt
LR	Luftraum
Lv <sub>e</sub>	<i>Length density of end points</i> , Längendichte der Endknöpfchen
Lv <sub>t</sub>	<i>Length density of triple points</i> , Längendichte der Septenkreuzungspunkte
m	männlich
M	molar
Massenspezif.	Massenspezifisch
mbar	Millibar
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
µm	Mikrometer
Na	Natrium

nm	Nanometer
NPar	Nicht-Parenchym
ns	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Par	Parenchym
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
S <sub>a</sub>	Gesamtalveolaroberfläche
S <sub>alv</sub>	Oberfläche der freien Alveolarsepten
Sep	Septengewebe
Surfactant	<i>surface active agent</i>
SURS	<i>Systematic Uniform Random Sampling</i> , Prinzip der systematischen, gleichförmigen, zufälligen Probenentnahme
Sv <sub>a</sub>	Gesamtalveolaroberflächendichte
Sv <sub>alv</sub>	Oberflächendichte der freien Alveolarsepten
T	<i>thickness</i> , arithmetische mittlere Dicke der Alveolarsepten
TLC	<i>Total lung capacity</i> , totales Lungenvolumen
TP	<i>Triple Points</i> , Septenkreuzungspunkte
VAP-1	<i>Vascular adhesion protein-1</i>
VC	<i>Vital capacity</i> , Vitalkapazität
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
V <sub>Endo</sub>	Volumen des Kapillarendothels
V <sub>EpilI</sub>	Volumen der Alveolarepithelzellen Typ II
V <sub>Ges</sub>	Gesamtvolumen
V <sub>Lunge</sub>	Lungenvolumen
V <sub>N-Lunge</sub>	Volumen nicht zur Lunge gehörender Strukturen
V <sub>Par</sub>	Volumen des Parenchyms
vs.	<i>versus</i> , gegenüber
V <sub>Sep</sub>	Volumen des Septengewebes
Vv <sub>Endo/Sep</sub>	Volumendichte des Endothels am Septum
Vv <sub>EpilI/Sep</sub>	Volumendichte der Alveolarepithelzellen Typ II am Septum
Vv <sub>Par/Lunge</sub>	Volumendichte des Parenchyms am Lungenvolumen
Vv <sub>Sep/Lunge</sub>	Volumendichte des Septums am Lungenvolumen
Vv <sub>Sep/Par</sub>	Volumendichte des Septums am Parenchymvolumen
w	weiblich

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Maus als Versuchstier im Labor

Die Maus als Labortier hat eine große Bedeutung für die Forschung erlangt, da sie das ganze Jahr hindurch leicht und günstig zu züchten ist und eine sehr kurze Generationszeit von nur 10-12 Wochen hat (Guénet JL 2003). Im Labor finden vor allem Inzucht-Stämme mit einer geringen genetischen Variabilität Verwendung, wodurch sie eine wichtige experimentelle Quelle zur Untersuchung von Stoffwechsel und von komplexen physiologischen Prozessen von Mammalia bieten (Paigen K 2000). Auch um einen experimentellen Zugang zu menschlichen Funktionen und Krankheiten zu finden, wird die Maus häufig als Modellorganismus verwendet.

Die verschiedenen in der Forschung genutzten Inzucht-Mausstämme weisen eine große Variabilität in der phänotypischen Ausprägung auf (Linder CC 2006). So zeigten sich bei den Mäusen verschiedener Stämme signifikante Unterschiede von Körpergewicht und Körperbau (Reed DR 2007), bei der Nozizeption (Mogil JS 1999), der Immunsuppression nach UVB-Bestrahlung (Noonan FP 1994), bei der Angiogenese (Rohan RM 2000), der Ausprägung von Infektionen nach einem Hirninfarkt (Schulte-Herbrüggen O 2006), bei der Antwort des Hirnstammes auf akustische Reize (Zheng QY 1999) und Morphine (Belknap JK 1998; Kest B 1999), der Reaktion auf Stress (Boyce-Rustay JM 2008) sowie im Verhalten (Crawley JN 1997; Ingram DK 1999).

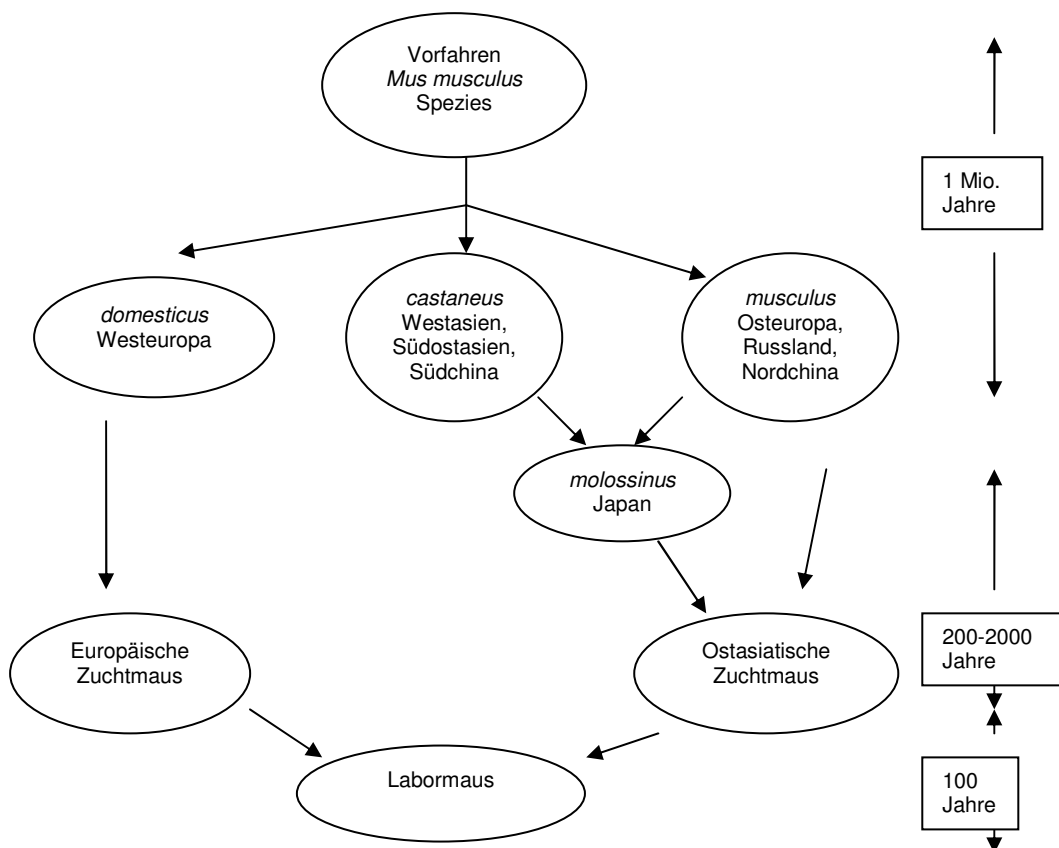
Es besteht die Notwendigkeit, die jeweiligen Phänotypen der zunehmend verwendeten transgenen Tiere und der verschiedenen Mutanten sowie der unterschiedlichen im Labor genutzten Inzucht-Mausstämme zu charakterisieren. Durch den Vergleich von Phänotypen und Genotypen wird die Identifizierung von Genfunktionen unterstützt. Das Wissen über spezifische phänotypische Eigenschaften einzelner Stämme erleichtert zudem die Auswahl von geeigneten Versuchstieren (Reinhard C 2002).

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit untersuchten Inzucht-Mausstämme, C3H/HeJ (C3H) und JF1/Msf (JF1), werden im Folgenden kurz vorgestellt.

## 1.2 Die Inzucht-Stämme

Inzucht-Mausstämme gehen aus Kreuzungen unter Geschwistern oder zwischen Nachkommen und Elterngenerationen hervor. Um einen Mausstamm als Inzucht-Stamm bezeichnen zu können, müssen mindestens 20 Generationen gekreuzt werden (Festing MFW 1991). Dadurch ist die Heterozygotie zwischen den Mitgliedern eines Stammes fast nicht existent, das heißt, sie haben ein weitgehend identisches genetisches Material mit Ausnahme einzelner spontaner Mutationen. Inzucht-Mausstämme bieten daher einen definierten und konstanten genetischen Hintergrund für *in-vivo* Analysen (Silver LE 1995).

Die Stämme C3H und JF1 sind sehr unterschiedlicher Abstammung (siehe Abb. 1) und unterscheiden sich somit genotypisch, aber auch im phänotypischen Bild.



**Abbildung 1 Stammbaum der *Mus musculus* Sub-Species**

Die Hypothese über die Abstammung der Labormäuse (Moriwaki K 1994). Drei gut entwickelte Subspezies von *Mus musculus* leiteten sich vor etwa einer Million Jahren von ihren Vorfahren ab. Danach mischten sich die asiatischen *M. m. musculus* und *M. m. castaneus* und daraus entstand eine lokale Rasse, „*M. m. molossinus*“, vermutlich vor einigen tausend Jahren. Es wurden zwei Arten von Zuchtmäusen entwickelt: Eine in Europa und die andere in Ostasien. Letztendlich wurden die Labormäuse aus einer Mischung von beiden Zuchtmäusen etabliert, wobei die europäischen Mäuse die größere und die ostasiatischen Mäuse die kleinere genetische Quelle waren. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme stammen als *M. m. domesticus* (C3H) von der europäischen Zuchtlinie und als *M. m. molossinus* (JF1) von der ostasiatischen Zuchtlinie ab. Modifiziert nach (Sakai T 2005)

### 1.2.1 C3H/HeJ – *Mus musculus domesticus*

*Mus musculus domesticus* wurde von einer relativ geringen Anzahl von Mausezüchtern aus Europa und Nordamerika aus der europäischen Wildmaus etabliert. Die Inzucht von C3H wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts begonnen (Beck JA 2000). Wie alle Inzucht-Stämme zeigt auch *Mus musculus domesticus* durch die ausgedehnte Züchtung eine Begrenzung des genetischen Polymorphismus und der phänotypischen Variabilität (Guénet JL 2003; Yoshiki A 2006). Eine phänotypische Besonderheit des C3H-Stammes ist ein genetischer Defekt, der zur Degeneration der Retina und damit zum Erblinden im frühen Erwachsenenalter führt (Dunn TB 1954).

### 1.2.2 JF1/Msf – *Mus musculus molossinus*

JF1, die *Japanese Fancy Mouse*, ist ein relativ junger Stamm aus Japan und stammt von der japanischen Wildmaus *Mus musculus molossinus* ab. Er wurde 1987 durch japanische Labors von dänischen Züchtern erworben und 1993 als Inzuchtstamm in der 20. Generation von Bruder-Schwester Paarungen auf den Markt gebracht. Die von Wildarten abgeleiteten Stämme sind in der Regel nicht so zahm wie die bislang genutzten Laborstämme. Anders die JF1-Mäuse, die äußerst lenkbar und gut zu handhaben sind, was sie auch für Maus-Verhaltensstudien interessant macht (Koide T 2000). Zudem weisen sie sowohl neue Varianten in den Phänotypen wie auch in den Allelen auf, die sie für zukünftige Studien sehr attraktiv machen. So besitzt JF1 das rezessive Allel für die gescheckte Fellfarbe (Koide T 1998).

## 1.3 Die Maus in der pneumologischen Forschung

In der pneumologischen Forschung sind Mäuse mittlerweile ebenfalls die am häufigsten verwendeten Versuchstiere. Neben der guten Handhabbarkeit und Züchtbarkeit ist auch die geringe Größe der Lungen von Vorteil, da Dünnschnitte durch das Organ leicht komplett auf einen Objektträger passen und somit morphologische Studien erleichtern (Faffe D 2002).

### 1.3.1 Unterschiede zwischen Inzucht-Stämmen

Eine Variabilität in strukturellen Parametern und in der Atemmechanik zwischen den genutzten Inzucht-Stämmen zeigt sich auch bei der Untersuchung der Lungen.

Im Vergleich von zwei Mausstämmen (C57B/6CrSlc und DBA/2CrSLC) zeigen sich signifikante morphometrische Unterschiede in der Größe des Luftraums und der Weite der alveolären Ductuli. Diese Unterschiede sind genetisch determiniert (Kida K 1989).

Reinhard *et al.* (2002) fanden signifikante Unterschiede des Lungenvolumens, der Dehnbarkeit (*Compliance*) und des Gasaustauschs beim Vergleich von sieben Mausstämmen. Auch Held und Uhlig (2000) beobachteten Unterschiede bei der *Compliance*, dem Atemwegswiderstand und dem pulmonalarteriellen Druck, aber auch bei der Ansprechempfindlichkeit auf Vaso- und Bronchokonstriktoren (Held HD 2000). Signifikante Unterschiede zeigten sich in der Größe der sauerstoffabhängigen Belastbarkeit von zehn Inzucht-Mausstämmen (Lightfoot JT 2001).

Deutliche Unterschiede bestehen in der Ruheatmung von Mäusen (Tankersley CG 1994), die wahrscheinlich genetisch determiniert (Tankersley CG 1997) und mit einer Region auf dem Chromosom 3 der Maus verknüpft sind (Tankersley CG 1998). Tankersley *et al.* (1999a) beschreiben ein deutlich größeres Lungenvolumen (Soutiere S 2004a), eine unterschiedliche Druck-Volumen-Beziehung und höhere Lungen*compliance* von Mäusen des C3H-Stammes im Vergleich zu C57BL/6J- (B6) und A/J-Stämmen (Tankersley C 1999a). Diese Parameter sind vererbbar, aber nicht genetisch assoziiert mit den zuvor beobachteten Unterschieden bei den in Ruheatmung erhobenen Parametern (Tankersley CG 1994). Die auch in dieser Arbeit verwendeten C3H-Mäuse haben ebenfalls eine größere Alveolarweite als B6-Mäuse (gemessen in *Mean Chord Length* als Indikator), allerdings gibt es keinen Zusammenhang mit dem größeren Lungenvolumen dieser Tiere. Vielmehr scheinen Alveolargröße und Lungenvolumen zwei voneinander unabhängige Kennzeichen der Lunge zu sein, die unterschiedlich reguliert werden (Soutiere S 2004b). Der Unterschied zwischen den Lungenvolumina besteht bereits direkt nach der Geburt der Mäuse, die unterschiedlichen Alveolarweiten hingegen entwickeln sich erst nach einigen Tagen (Soutiere S 2006).

Beschrieben werden auch Unterschiede in der Fähigkeit verschiedener Inzucht-Mausstämmen, unter Sauerstoffmangel zu überleben. Junge Mäuse des Balb/c-Stammes sind im Vergleich mit dem SWR-Stamm resistent gegenüber Hypoxie (Tankersley CG 1999b). Signifikant sind auch die Unterschiede zwischen

acht Inzucht-Stämmen bei der Reaktion auf einen Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R) der Lunge. Die Ausprägung der gewöhnlich ansteigenden Permeabilität des Alveolarendothels und damit des Ödems war in den Stämmen unterschiedlich. Es lässt sich eine genetische Sensibilität der Lunge für I/R vermuten, die über multiple Gene vererbt wird (Dodd-o JM 2005).

Zwischen Inzucht-Mausstämmen besteht eine sehr große Variabilität beim Risiko, medikamenteninduziert asthma-ähnliche Veränderungen zu entwickeln (Brewer JP 1999). Dies ist vor allem auf genetische Unterschiede zurückzuführen, entsprechende Genorte wurden identifiziert (Kleeberger SR 2000; Ohtsuka Y 2000). Die Inhalation des Pilzes *Stachybotrys chartarum* löst bei verschiedenen Stämmen unterschiedlich ausgeprägte Entzündungsreaktionen in der Lunge aus (Rosenblum Lichtenstein JH 2006). Uneinheitlich zwischen den Stämmen sind auch die Reaktionen der Lungen auf Entzündungen nach Antigeninstillation. Während die einen Stämme (A/J) typische Eigenschaften des Umbaus der Luftwege zeigen, reagieren C3H-Mäuse lediglich mit einer leicht vermehrten Ablagerung von Kollagen (Shinagawa K 2003). Dies wird ebenfalls durch den genetischen Hintergrund beeinflusst und zum Teil durch *vascular adhesion protein-1* (VAP-1) reguliert (Singh B 2005).

### 1.3.2 Unterschiede zwischen den Geschlechtern

Wilborn *et al.* beschreiben bereits 1968 einen höheren Sauerstoffverbrauch von submandibulären Drüsen weiblicher Mäuse im Vergleich zu denen männlicher Mäuse. Nach Kastration sowie nach Verabreichung von Östrogenen erhöhte sich der Sauerstoffverbrauch der Drüsen männlicher Tiere auf das Level der Weibchen, wohingegen der Sauerstoffverbrauch der Weibchen nach Injektion von Testosteron abnahm (Wilborn WH 1968). Carey *et al.* (2007b) haben gezeigt, dass männliche Mäuse ein höheres Atemzugvolumen sowie eine höhere inspiratorische Spitzenflussrate haben als weibliche Mäuse (Carey MA 2007b). Eine Studie fand heraus, dass erwachsene weibliche Ratten, die bei Bewusstsein waren, stärker mit Hyperventilation auf Hypoxie antworten als Männchen. Dieser Effekt war auch bei ovariectomierten Ratten nachweisbar sowie bei Ratten vor der Geschlechtsreife (Mortola JP 1996). Card *et al.* (2006) beobachteten, dass männliche B6-Mäuse eine erhöhte Ansprechbarkeit auf cholinerge Stimulation haben (Card JW 2006), welche durch männliche Geschlechtshormone über einen vagalen Reflex vermittelt werden (Card JW 2007). Bei einer Reihe von Inzucht-Mausstämmen wurden mehr oder



weniger stark ausgeprägte geschlechtsspezifische Unterschiede bei Bau und Funktion der Lunge festgestellt (Reinhard C 2002). So ist die Vitalkapazität der Lungen von Weibchen zwar kleiner als die der Männchen, bezogen auf das Körpergewicht aber kehrt sich dieses Verhältnis um (Schulz H 2002). Weibliche Mäuse haben, auf das Körpergewicht bezogen, eine größere Anzahl an Alveolen und eine größere alveoläre Oberfläche der Lunge und damit eine größere Austauschfläche für den Sauerstoff-(O<sub>2</sub>)-Transport (Massaro G 1995).

Die Entwicklung und Erhaltung der vollen Anzahl an Alveolen bei weiblichen Individuen steht unter dem Einfluss von weiblichen Geschlechtshormonen. Erstmals entdeckten Mendelson *et al.* (1980) östrogen-bindende Komponenten in der Lunge (Mendelson CR 1980), Moser und Daxenbichler fanden ein progesteron-bindendes Protein ([<sup>3</sup>H]R5020) in Rattenlungen (Moser EH 1982) und Mollerup *et al.* (2002) wiesen die Expression der Östrogenrezeptoren alpha (ER-α) und beta (ER-β) in der Lunge nach (Mollerup S 2002). Sie werden in den Epithelzellen der Lunge exprimiert (Heldring N 2007) und finden sich auf respiratorischen Motoneuronen (Behan M 2005). Von Massaro *et al.* (2006; 2007) wurde gezeigt, dass die Östrogenwirkungen durch ER-α und ER-β vermittelt werden (Massaro D 2006; Massaro D 2007). Couse *et al.* (1997) beobachteten, dass die biologische Funktion von ER-β abhängig ist von der Anwesenheit von ER-α (Couse JF 1997). Eine genetische Ausschaltung von ER-α oder ER-β senkt die Anzahl und erhöht die Größe der Alveolen bei Mäusen (Patrone C 2003; Massaro D 2004; Massaro D 2006). Dies wird bei weiblichen Tieren deutlicher als bei männlichen, wobei männliche Ratten geringere Mengen an ER-β aufweisen als Weibchen (González-Arenas A 2004). Zudem führt der Mangel an ER-β zu einem Abfall der Aktivität von *platelet-derived growth factor* (PDGF) und von *granulocyte-macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) (Patrone C 2003). PDGF ist essentiell für die Regulation der Alveolarisierung und GM-CSF für die Regulation des Surfactant. Knockoutmäuse, denen ER-β fehlt, entwickeln bis zum fünften Lebensmonat eine fibrotische Lunge, die Septen verdicken sich und der Kollagengehalt der Lunge nimmt zu (Morani A 2006).

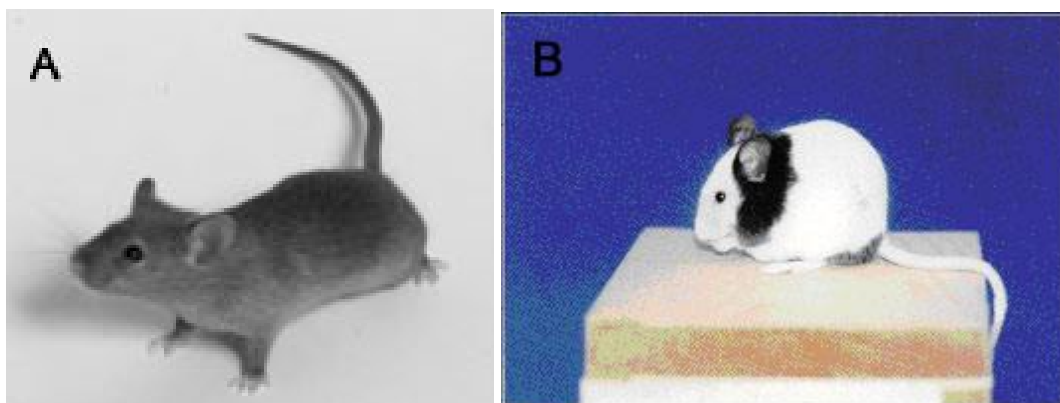
Männliche Geschlechtshormone spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung der Lunge. Die Lungenreifung sowie die Surfactantproduktion bei männlichen Individuen vieler Spezies sind deutlich verzögert im Vergleich zu weiblichen Individuen (Nielsen HC 1981; Torday JS 1981; Torday JS 1984). Die Surfactantproduktion wird auch über Androgenrezeptoren reguliert (Nielsen HC 1985; Dammann CEL 2000). Giannopoulos und Smith wiesen nach, dass Androgenrezeptoren in der fetalen Lunge exprimiert werden (Giannopoulos G 1982;

Kimura Y 2003). Auch wurde für das Kaninchen gezeigt, dass größere Mengen an Androgenen den Geschlechtsunterschied verstärken. Die Zuführung von Androgenen in der Schwangerschaft verzögert die Lungenreifung, wohingegen die Zuführung von Anti-Androgenen den Geschlechtsunterschied in der Lungenreifung aufhebt, denn die Surfactantproduktion steigt bei den männlichen Tieren bis auf den gleichen Level wie bei weiblichen Tieren an (Nielsen HC 1982).

Der Grund für diese Geschlechtsunterschiede liegt in den Anforderungen an den weiblichen Organismus während Schwangerschaft und Stillzeit begründet. Weibliche Mäuse, die drei- bis viermal im Jahr Junge austragen können, benötigen in dieser Zeit vermehrt Sauerstoff, und somit muss eine größere Austauschfläche zur Verfügung gestellt werden. Da dieser Unterschied auch bei weiblichen Mäusen auffällig wurde, die nie getragen haben, wird eine evolutionäre Adaption vermutet (Massaro G 1995; Reinhard C 2002).

### 1.3.3 C3H und JF1 – so unterschiedlich wie Maus und Maus

In den dargestellten Studien hat sich immer wieder gezeigt, dass die Unterschiede zwischen den Inzucht-Stämmen meist genetisch determiniert sind. Darum sollten zwei Stämme, die derartig verschiedener Abstammung sind wie C3H (*Mus musculus domesticus*) und JF1 (*Mus musculus molossinus*), sich phänotypisch deutlich unterscheiden (Siehe Abb. 2A und 2B) und in Aufbau und Funktionsparametern der Lunge differieren.



**Abbildung 2 Die Mäuse**

A) Maus des C3H/HeJ-Stammes (<http://jaxmice.jax.org/library/notes/491p.html>) B) Maus des JF1/Msf-Stammes (Koide T 1998).

Tatsächlich konnten Reinhard *et al.* (2005) nachweisen, dass die beiden Stämme höchst divergente Phänotypen hinsichtlich ihrer Lungenfunktion aufweisen. Bei der Bestimmung des Lungenvolumens von neun Inzucht-Mausstämmen (C3H > BALB/cByJ > A/J > B6 > 129Sv/ImJ > FVB/nJ > SWR/J > PWD/Ph > JF1, aufgezählt in der Reihenfolge der Größe des Lungenvolumens) zeigte sich, dass die C3H-Mäuse von allen das größte Lungenvolumen aufweisen, während JF1-Mäuse das kleinste besitzen (Reinhard C 2005). Neben einem deutlich höheren Körpergewicht der C3H-Mäuse (Reed DR 2007) haben diese auch ein größeres Totraumvolumen als der JF1-Stamm. Die *Compliance* der Lungen der Tiere des JF1-Stammes ist niedriger als die des C3H-Stammes, und die Lungen der Mäuse dieses Stammes haben eine geringere Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (CO). Leicht reduziert, aber noch immer vorhanden, waren die Unterschiede nach Normierung der Werte auf das Körpergewicht oder die Lungengröße, lediglich die Diffusionskapazität stellte sich bei den JF1-Mäusen nach Normierung auf das Alveolarvolumen größer dar als bei den C3H-Mäusen.

Durch Identifizierung der Genloci für die entsprechenden Lungenfunktionsparameter war es auch möglich, Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Stämmen festzustellen, die besonders die Entwicklung der Lunge betreffen. Dazu gehören Auf- und Abbau von extrazellulärer Matrix, Zellwachstum und Differenzierung und Vaskulogenese (Ganguly K 2007).

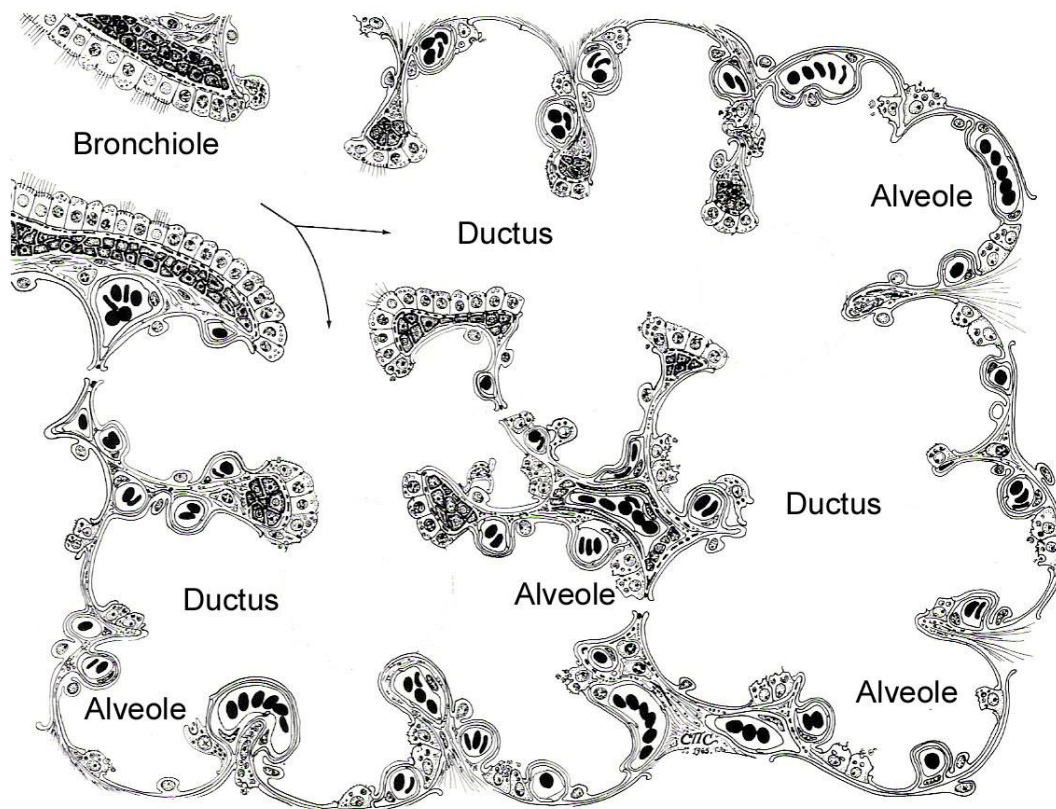
Innerhalb der Stämme wurden Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt. Bei Untersuchungen des C3H-Stammes zeigte sich, dass die männlichen Mäuse ein signifikant höheres Körpergewicht und Lungenvolumen besitzen, sich dieses Verhältnis aber umkehrt, wenn man das Lungenvolumen auf das Körpergewicht normiert (Reinhard C 2002). Keine Geschlechtsunterschiede hingegen wurden für die *Compliance* und die Diffusionskapazität beobachtet.

Schulz *et al.* (2002) ermittelten für die männlichen JF1-Mäuse ein signifikant größeres Körpergewicht (KG) als für die Weibchen. Zudem haben die Männchen eine höhere Vitalkapazität (*vital capacity*, VC), bei Mäusen entspricht diese ca. 90% des Lungenvolumens (Lai YL 2000), ein höheres inspiratorisches Reservevolumen (*inspiratory reserve capacity*, IRC), und die *Compliance* der Männchen ist größer als die der Weibchen. Bei Normierung auf das Körpergewicht bzw. auf die Vitalkapazität hingegen zeigte sich, dass die Weibchen signifikant höhere Werte für das Totraumvolumen/VC, die VC/KG und das IRC/KG besitzen.

## 1.4 Der Aufbau des Gasaustauschbereichs der Lunge

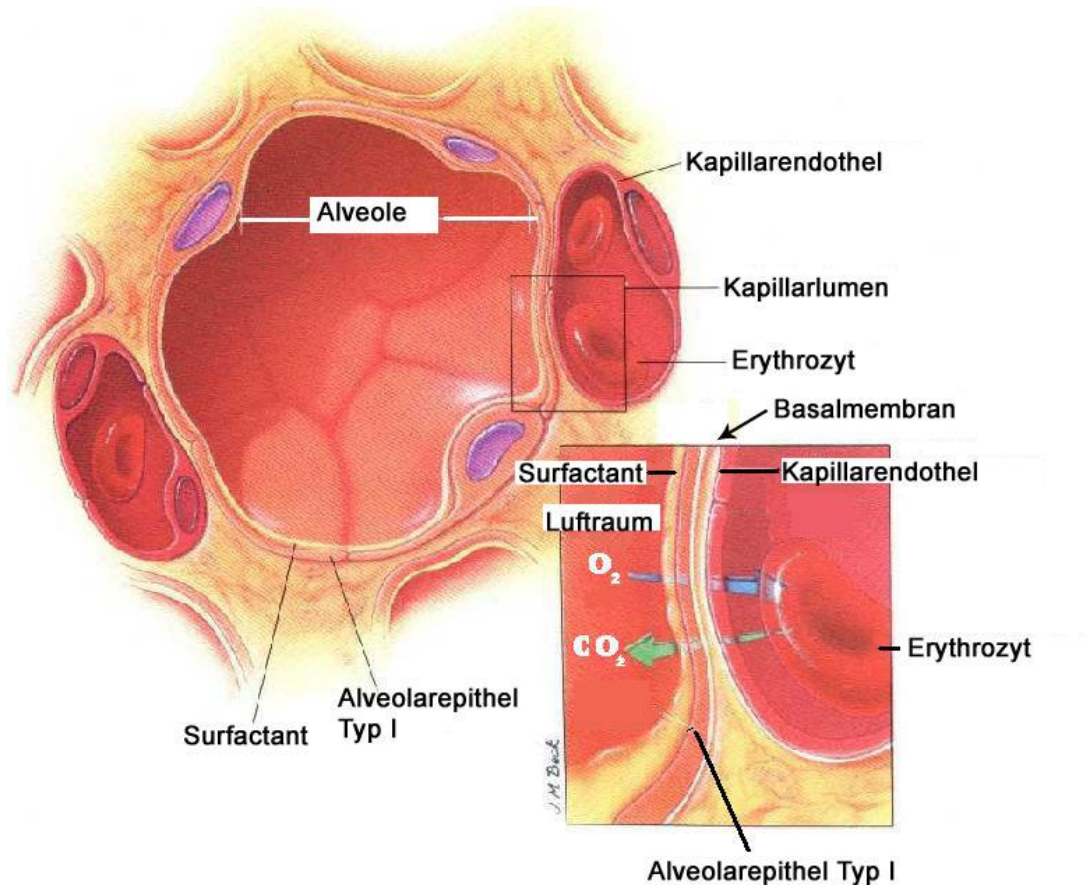
Die Lunge ist aufgeteilt in den luftleitenden Teil und den eigentlichen respiratorischen Trakt. Das respiratorische Gewebe besteht beim Menschen aus den Bronchiolen, den Alveolargängen und Alveolen (siehe Abb. 3), bei der Maus besteht der respiratorische Abschnitt nur aus dem Alveolarbereich.

Die Lunge dient dem Gasaustausch des Körpers mit der umgebenden Luft. Dieser Gasaustausch erfolgt durch Diffusion, die Diffusionskapazität ist strukturell bestimmt durch die Größe der Alveolaroberfläche und durch die Dicke der Blut-Luft-Schranke. Die kleinste Einheit des Gasaustausches sind die Alveolen, hier geschieht der Austausch von  $O_2$  und Kohlendioxid ( $CO_2$ ). Sie sind vollständig von Epithel ausgekleidet. Es gibt zwei Zelltypen, die dieses Epithel bilden, Alveolarepithelzellen Typ I und II (siehe Abb. 4).



**Abbildung 3 Der respiratorische Trakt des Menschen**

Dargestellt ist der respiratorische Trakt der Lunge. Der Luftstrom führt über die Bronchiolen (*Bronchioli respiratorii*) in die alveolären Ductuli, um anschließend die Alveolen zu belüften. Bei der Maus hingegen fehlen die *Bronchioli respiratorii*. Modifiziert nach (Sorokin S 1966).



**Abbildung 4 Der Gasaustauschbereich der Lunge**

Zeichnung einer Alveole der Lunge. Der kleine Ausschnitt zeigt vergrößert das Alveolarseptum. Entlang der nur von einer Basalmembran getrennten Schicht zwischen Kapillarendothel und den von Surfactant bedeckten Alveolarepithelzellen Typ I findet der Gasaustausch in der Lunge statt.  $O_2$  diffundiert aus dem ventilerten Luftraum der Alveole in das Kapillarlumen, wird dort von Erythrozyten aufgenommen, an Hämoglobin gebunden und abtransportiert.  $CO_2$  diffundiert entsprechend in die andere Richtung und wird mit der Atemluft abgeatmet. Stabilisiert wird das Alveolarseptum durch das Interstitium, das den Raum zwischen den Kapillaren ausfüllt.

Modifiziert nach <http://www.acilveilkaydim.com/acilbakim/alveol.JPG>

#### 1.4.1 Alveolarepithelzellen Typ I

Die Alveolarepithelzellen Typ I bilden die Begrenzung vom Alveolarseptum zum Luftraum. Es sind lang ausgestreckte Zellen, die fast ausschließlich aus einem dünn ausgezogenen Zytoplasmaleib mit wenig Zellorganellen bestehen und mit ihrer dem Luftraum abgewendeten Seite einer Basalmembran aufliegen. Dadurch wird die Diffusionsbarriere möglichst dünn (ca.  $2,2 \mu m$ ) gehalten. Die einzelnen Zellen sind durch *Tight Junctions* fest miteinander verbunden und bilden damit eine durchgehende Barriere gegenüber dem Luftraum (Weibel ER 1984a).

### 1.4.2 Alveolarepithelzellen Typ II

Die kuboidal geformten Alveolarepithelzellen Typ II sind nicht am Gasaustausch beteiligt, vielmehr sind sie die sezernierenden Anteile des Epithels der Lunge, und ihr Zytoplasma ist reich an Zellorganellen. Sie verfügen über Mitochondrien, ein ausgeprägtes endoplasmatisches Reticulum mit Ribosomen und einen Golgi-Apparat. Zusätzlich finden sich darin die charakteristischen Lamellarkörperchen (*lamellar bodies*, LB), in denen Phospholipide und Surfactantproteine gespeichert werden. Die LB geben ihren Inhalt per Exozytose in den Alveolarraum ab. Die sezernierten Phospholipide und Surfactantproteine bilden einen Film zwischen Alveolarepithel und Luftraum, der so dünn ist, dass er den Gasaustausch der Lunge nicht beeinträchtigt (Bachofen H 2001). Diese Schicht aus Phospholipiden und Proteinen wird Surfactant genannt und dient der Regulierung der Oberflächenspannung der Lunge. Das Surfactant bildet eine monomolekulare Schicht aus, deren hydrophile Enden sich der Epithelschicht zuwenden, die hydrophoben Anteile dem Alveolarraum (Weibel ER 1968). So wird die Oberflächenspannung bei Inspiration und Expiration reguliert und in kleinen wie großen Alveolen gleich gehalten. Damit wird verhindert, dass durch erhöhte Wandspannung in kleineren Alveolen sich diese in große entleeren, sie kollabieren und sich Atelektasen ausbilden. Zudem wird das Einatmen erleichtert (Weibel ER 1984b; Veldhuizen R 2004; Ikegami M 2006; Fehrenbach H 2007a). Wichtige Komponenten der Phospholipidschicht sind die Surfactantproteine SP-B und SP-C, die hydrophob und damit mit entscheidend für die biophysische Aktivität der Lunge sind (Schürch S 1998; Walther FJ 2007).

Eine weitere Aufgabe des Surfactant ist die Unterstützung der Abwehrmechanismen der Lunge über die Proteine SP-A und SP-D. Diese binden verschiedene Pathogene und erleichtern deren Elimination durch Makrophagen (Crouch EC 2000; Fehrenbach H 2001).

Da die Alveolarepithelzellen Typ I nicht zur Replikation fähig sind, erfolgt die Reparatur durch Alveolarepithelzellen Typ II. Kommt es zu einer Verletzung einer Alveolarepithelzelle Typ I, so kann sich eine Alveolarepithelzelle Typ II durch mitotische Teilung und Transformation innerhalb von 2-5 Tagen zu einer Alveolarepithelzelle Typ I differenzieren (Cheek JM 1989; Fehrenbach H 1999). Diese übernimmt dann die Aufgaben der Schutzfunktion und des Gasaustausches. Die Fähigkeit zu sezernieren geht dabei allerdings verloren (Weibel ER 1984a).

### 1.4.3 Die Kapillaren und das Kapillarendothel

Die Kapillaren verlaufen in den Alveolarsepten. Sie sind von Kapillarendothel ausgekleidet. Auf einer Seite der Kapillare verläuft Bindegewebe. Nur ein sehr kleiner interstitieller Raum trennt Epithel und Endothel voneinander. Auf der anderen Seite, wo der Gasaustausch stattfindet, sind die Basalmembranen der beiden Zelltypen miteinander verschmolzen. Somit bilden sie dort eine einzige Membran, durch die O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> diffundieren (Gehr P 1978a).

Auch die Endothelzellen der Kapillaren sind also Teil der Diffusionsbarriere der Lunge. Sie kleiden die Kapillaren aus, sind dünn ausgezogen und die Kerne sind nur von einem schmalen Saum Zytoplasma umgeben. Die *Tight Junctions*, die die einzelnen Zellen miteinander verbinden, sind durchlässiger als die des Epithels und ermöglichen damit einen Flüssigkeitsaustausch mit dem Interstitium. Zudem sind die Endothelzellen in der Lage, *angiotensin converting enzyme* (ACE) zu synthetisieren und zu sezernieren. Sie sind damit am Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiv beteiligt (Ryan US 1984).

### 1.4.4 Das Interstitium

Neben dem Surfactant, das die Oberflächenspannung der Alveolen reguliert, dienen auch die extrazellulären Fasern des interstitiellen Raumes der Stabilisierung des Lungengerüsts und sind dafür essentiell. Ein Mangel an Surfactant würde die Alveolen zum Kollabieren bringen, die Ductuli alveolares werden durch die elastischen und kollagenen Fasern stabil gehalten (Weibel ER 1984b).

Das Bindegewebe der Lunge teilt sich in periphere Gewebeelemente, die von der Pleura in die interlobulären und intersegmentalen Septen ziehen und in axiales Bindegewebe, das mit den Luftwegen verläuft und bis in die alveolären Ductuli zieht. Zusätzlich werden auch die Alveolarsepten von extrazellulären Fasern durchzogen. Diese stehen sowohl mit dem axialen als auch mit dem peripheren Bindegewebe in Verbindung und sind mit den in den Septen verlaufenden Kapillaren verflochten (Bachofen H 2001). Das Bindegewebe der Alveolen ist somit der Teil des Alveolarseptums, welches eine tragende Rolle bei der Belastung durch die Atmung spielt (Mercer RR 1994).

Der interstitielle Raum, das Interstitium, wird von Fibrozyten gebildet. Diese können das Bindegewebe während des Wachstums und bei Verletzungen aktiv umbauen und reparieren (Suki B 2005). Die Fibrozyten bilden lange, verzweigte Ausläufer und



produzieren Kollagen und Elastin, die Hauptelemente des Bindegewebes der Lunge (Setnikar I 1955; Vaccaro C 1978).

#### 1.4.4.1 Elastische und kollagene Fasern

Als Proteine der extrazellulären Matrix bilden Elastin und Kollagen das Gerüst für die Struktur der Alveolen (siehe Abb. 5).

Elastin als amorphe Grundsubstanz der elastischen Fasern hat eine hohe Dehnbarkeit und kann bei der Inspiration bis auf 200% seiner entspannten Länge gedehnt werden, bevor es reißt. Es bildet somit die Grundlage für die Elastizität des Parenchyms und der Luftwege für die wiederholte Inspiration und der damit verbundenen Dehnung der Faser und für die Expiration, bei der es zur Rückführung des Gewebes kommt (Starcher B C 2000). Elastin wirkt wie eine „Sprungfeder“ und ist damit maßgeblich für die *Compliance* der Lunge verantwortlich (Shifren A 2007).

Kollagen hingegen ist praktisch nicht dehnbar, es ist in den Septen bei entspannter Lunge geschlängelt angeordnet (Toshima M 2004) und ermöglicht somit bei der Atmung, dass sich die Lunge bei der Inspiration trotzdem ausdehnen kann, limitiert aber durch seine Länge das Maß der Ausdehnung und damit auch das Lungenvolumen (Weibel ER 1984b; Mercer RR 1990).



**Abbildung 5 Elastische und kollagene Fasern im Alveolarseptum**

Ein Modell des Alveolarseptums zeigt das Kapillarnetz (rot), durchwoben mit Fasern des Interstitiums (grün). Das Interstitium wird zum Luftraum hin durch Alveolarepithel Typ I (gelb) begrenzt (Weibel ER 2008).



Die Fasertypen wirken in der Lunge nicht unabhängig voneinander, vielmehr ergänzen sich ihre Wirkungen (Yuan H 2000). Ihr Einfluss auf die Elastizität der Lunge wird daran deutlich, dass sich postpartal der intrapulmonale Elastin- und Kollagengehalt deutlich erhöht (Wasowicz M 1998; Tanaka R 2001) und die Steifheit der Lunge abnimmt (Tanaka R 1999). Im Alter hingegen nimmt die Menge elastischer Fasern ab, während der Kollagengehalt der Lunge steigt, sich die Alveolarsepten verdicken (Escobar JD 1997) und die Lunge an Elastizität verliert (D'Errico A 1989).

In den Alveolarsepten der Lunge sind Elastin und Kollagen nicht gleichmäßig verteilt. Elastin findet sich besonders in den freien Enden der Alveolarsepten, den Endknöpfchen, sowie an den Punkten, an denen sich zwei Septen in einem Winkel verbinden. Es findet sich aber auch in geringer Menge in den Alveolarwänden und verleiht damit der Konfiguration der Alveolaroberfläche Stabilität (Oldmixon E 1989a). Auch Kollagen findet sich vermehrt in den Endknöpfchen, aber ebenso in den Alveolarwänden (Rosenquist TH 1981). Dort ist es gleichmäßig verteilt und unterstützt damit die Stabilität des Alveolargerüsts (Oldmixon E 1989b; Wood J 1998; Toshima M 2004).

## 1.5 Der medizinische Hintergrund

Auch bei der Entstehung von Erkrankungen des respiratorischen Systems spielen Elastin und Kollagen eine wichtige Rolle. Dies soll am Beispiel der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) erläutert werden.

Erkrankungen des respiratorischen Systems sind charakterisiert durch eine beschleunigte Abnahme der Lungenfunktion. Dazu gehört auch die chronisch obstruktive Lungenerkrankung. Assoziiert ist die COPD mit einer Vielzahl von Umweltfaktoren wie Luftverschmutzung, schlechter Ernährung, beruflicher Exponiertheit gegenüber Noxen, aber insbesondere dem Zigarettenrauchen (Valencia SS 2004). Obwohl Rauchen in einigen Ländern abnimmt, steigt weltweit die Prävalenz von COPD. Sie ist die vierthäufigste Todesursache in den Industrieländern (Barnes PJ 2004).

Die COPD wird durch zunehmende Entwicklung einer Begrenzung des Luftstroms in der Lunge, das heißt eine Abnahme der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ), charakterisiert, die nicht voll reversibel ist (American Thoracic Society 1995). Der Ausdruck COPD umfasst chronisch obstruktive

Bronchitis mit Obstruktion der kleinen Luftwege und Emphysem mit Vergrößerung von Luftraum und Zerstörung des Lungenparenchyms. Die Elastizität der Lunge geht verloren. Es kommt zur funktionellen Beeinträchtigung der Lunge mit chronischem Husten, gesteigerter Sputumproduktion, Atemnot, Atemwegsobstruktion und eingeschränktem Gasaustausch. Der Verlauf der Erkrankung ist progredient (Worth H 2002).

Das Emphysem ist definiert als „abnorme permanente Vergrößerung des Luftraumes distal der *Bronchioli terminalis* und Zerstörung der Alveolarwände ohne offensichtliche Fibrose“ (American Thoracic Society 1995). Es gibt zwei Konzepte, die die Entstehung des Emphysems erklären können (Park JW 2007; Fehrenbach H 2007b; Koczulla AR 2008). Zum einen vermutet man einen Zusammenhang mit einem mit Entzündung in Verbindung stehenden Ungleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen. Darüber kommt es zum Abbau von Matrixkomponenten, vor allem von Elastin, und zum Verlust des Alveolarseptums (D’Armiento J 1992; Hogg JC 2002; Takubo Y 2002). Zum anderen vermutet man, Apoptose von Endothelzellen und Alveolarepithelzellen seien ursächliche Faktoren für die Entstehung des Emphysems (Shapiro SD 2000; Henson PM 2006; Taraseviciene-Stewart L 2006; Siafakas NM 2007). Apoptose von Endothelzellen wird unter anderem durch *vascular endothelial growth factor* (VEGF) beeinflusst, der bei Emphysem vermindert exprimiert wird (Kanazawa H 2007). Unabhängig vom biochemischen Weg, der zum Emphysem führt, ist das Ergebnis immer ein Verlust von Alveolarsepten und eine Vergrößerung des alveolaren Luftraumes.

Morphologisch gesehen scheinen hierfür die Ursachen vor allem in der Deformierung und dem Verlust von Elastin sowie in der Umgestaltung von Kollagen in der Alveolarwand zu liegen (Snider GL 2000; Pastor LM 2006). Bereits die angeborene Menge an Elastin in der Lunge scheint entscheidend für die Tendenz zu sein, ein Emphysem zu entwickeln (Shifren A 2007).

In der emphysematösen Lunge verzeichnet man einen deutlichen Anstieg des Kollagengehalts (Lang MR 1994; Finlay GA 1996; O’Donnell MD 1999) und damit einhergehend eine Verdickung der Alveolarwand (Verbeken 1992; Vlahovic G 1999). Gerade durch diese Verdickung der Alveolarwand kommt es zu einer Abnahme des effizienten Gasaustausches beim Emphysem. Doch hat Kollagen in der emphysematösen Lunge nicht nur Einfluss auf den Gasaustausch. Zwar kommt es zu einem Anstieg des Kollagengehaltes, gleichzeitig ist es aber vulnerabler. Emphysematöse Lungenregionen sind deutlich fragiler als normales Lungenparenchym und werden bereits durch mechanische Kräfte geschädigt, die 40% geringer sind als sie nötig wären, um gesundes Lungenparenchym zu

verletzen (Ito S 2005). Die Zerstörung von Kollagen, das durch seine stabile Konstitution normalerweise die Struktur der Alveolen aufrechterhält, verändert die Balance der Kräfte in der Lunge und trägt so mit zur Entstehung emphysematöser Läsionen bei (Foronjy RF 2003). Im Vergleich mit den übrigen Geweben sind es vor allem die elastischen und kollagenen Fasern, die durch auf die emphysematöse Lunge wirkenden mechanischen Kräfte deformiert und zerstört werden. Schon reine mechanische Kraft ohne die Einwirkung von Enzymen und Proteasen ist ausreichend, um zur Zerstörung von Parenchym zu führen (Kononov S 2001). Somit spielen nicht nur die biochemischen Vorgänge eine Rolle bei der Entstehung des Emphysems, auch mechanische Krafteinwirkungen tragen einen Teil dazu bei (Suki B 2003).

Jeder Raucher lagert eine Vielzahl von Partikeln und Rauchbestandteilen in die Lunge ein. Trotzdem entwickelt nicht jeder Raucher eine COPD mit Emphysem, sondern nur ca. 15%. Diese Unterschiede in der individuellen Empfindlichkeit betreffen auch das Alter bei Beginn der Erkrankung sowie die Geschwindigkeit des Fortschreitens. Das legt den Verdacht nahe, dass eine genetische Beeinflussung den Verlauf der COPD determiniert (Coultais DB 1991; Barnes PJ 2000; Shifren A 2006; Warburton D 2006). Eine ganze Reihe von Kandidatengenen wurde mittlerweile identifiziert, denen man eine Rolle bei der Entwicklung der Heterogenität des klinischen Phänotyps der Erkrankung zuschreibt (Wood AM 2006; Shi W 2007). Auch wenn das Emphysem eine sehr verbreitete Erkrankung der Lunge ist, so sind viele Aspekte seiner Entstehung heute noch nicht ausreichend erforscht (Foronjy RF 2001). Mäuse sind besonders in Verbindung mit Zigarettenrauch sehr wertvoll für die Analyse der Pathogenese des Emphysems (Suzuki M 2008); (Sato A 2008). Tiermodelle, die auf Experimenten mit der Maus basieren, erlauben, frühe Stufen der Schädigung der Lunge zu evaluieren und potentielle neue Therapienformen zu erproben. Genetische Manipulationen, die erlauben, die Rolle bestimmter Gene zu beurteilen, sind möglich. Denn offensichtlich spielt die genetische Prädisposition eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung vom Emphysem bei Mäusen nach Zigarettenrauchexposition (Kanazawa H 2007). Auch in anderem Kontext als dem Rauchen kann die Forschungsarbeit an Mäusen Informationen liefern hinsichtlich der Frage nach dem Mechanismus, der zum Emphysem führt (Hogg JC 2002).

## 2. Zielsetzung der Arbeit

In zwei Studien wurden geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Mäusen der beiden Inzucht-Stämme C3H/HeJ und JF1/Msf festgestellt. Bei Untersuchungen des C3H-Stammes wiesen Reinhard *et al.* (2002) nach, dass die Männchen ein größeres Körpergewicht und Lungenvolumen besitzen als die Weibchen. Nach Körpergewichtsnormierung kehrte sich dieses Verhältnis um. Schulz *et al.* (2002) ermittelten für die männlichen JF1-Mäuse ein größeres Körpergewicht als für die Weibchen. Die JF1-Männchen hatten eine höhere Vitalkapazität, ein höheres inspiratorisches Reservevolumen und die *Compliance* der Männchen war größer als die der Weibchen. Bei Normierung auf das Körpergewicht hingegen zeigte sich, dass die Weibchen die signifikant höheren Werte für die VC/KG besaßen.

In einer weiteren Studie zeigten Reinhard *et al.* (2005), dass stammspezifische Unterschiede zwischen C3H und JF1 bestehen. Lungenvolumen, Körpergewicht und *Compliance* der C3H-Mäuse sind größer als der JF1-Mäuse, die Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid ist nach Körpergewichtsnormierung allerdings kleiner als bei den JF1-Mäusen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu überprüfen, ob für die festgestellten Unterschiede zwischen Funktionsparametern der Lungen der Inzucht-Mausstämme C3H und JF1 und zwischen den Geschlechtern der beiden Stämme morphologische Korrelate zu finden sind. Dabei sollen sowohl die Stämme als auch die Geschlechter miteinander verglichen werden.

Hierzu werden an den Lungen männlicher und weiblicher Tiere (n=6 pro Gruppe) auf stereologischen Verfahren basierende elektronenmikroskopische sowie lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die einzelnen Bestandteile des Lungenparenchyms und der Alveolarsepten (Alveolarepithelzellen I und II, Kapillarendothel, Interstitium mit Elastin und Kollagen) sollen quantifiziert, die Alveolaroberfläche bestimmt und der Luftraum charakterisiert werden.

Durch die Erhebung von grundlegenden Daten über den Aufbau des Alveolarseptums soll die Auswahl passender Versuchstiere in der zukünftigen pneumologischen Forschung erleichtert werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Die Präparation

Es wurden je zwölf Mäuse der Stämme *Mus musculus molossinus* JF1/Msf (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, GSF, München, Deutschland) und *Mus musculus domesticus* C3H/HeJ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) ausgewählt. Die C3H-Mäuse wurden im Alter von 10-11 Wochen erworben. Beide Stämme wurden bis zum Alter von 12-14 Wochen in isolierten, ventilierten Käfigen gehalten, bei einem 12 h/12 h hell/dunkel Zyklus. Futter und Wasser wurden *ad libitum* angeboten.

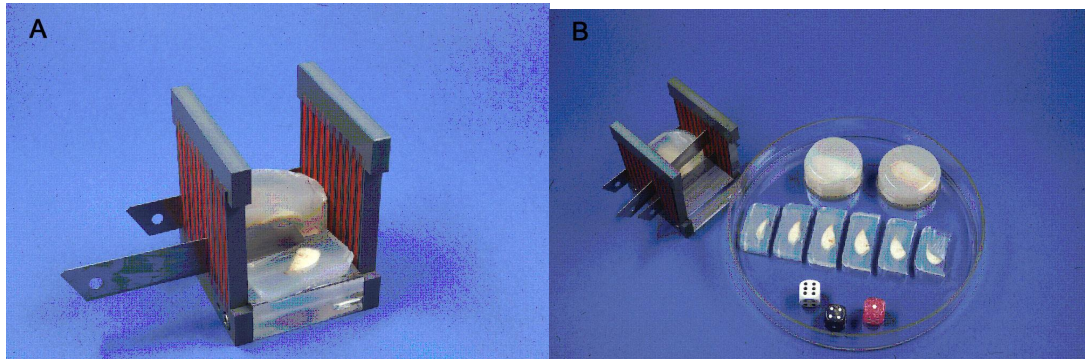
Jeweils sechs Männchen und sechs Weibchen beider Stämme wurden gewogen (Waage Typ 1507, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland). Danach erfolgte die Tötung durch Genickbruch. Bauch und Thorax der Mäuse wurden eröffnet und die Trachea freipräpariert, eine Mastracheal-Kanüle (Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland) eingeführt und durch Ligation fixiert. Über die Trachealkanüle wurde die Lunge im offenen Thorax mit Fixativ [1% Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland), 1% Paraformaldehyd in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (Merck, Darmstadt, Deutschland), pH 7,4] bei einem hydrostatischen Druck von 20 cm Wassersäule über ein Instillationsgerät (Eigenanfertigung) fixiert (Fehrenbach H 1998). Nach 20 Minuten ligierte man die Trachea fest und präparierte die Lungen aus dem Thorax heraus. Die entnommenen Lungen wurden über Nacht bei 4°C in einem Gläschen frei schwebend im Fixativ (s.o.) gelagert.

Am nächsten Tag präparierte man die Lungen frei, wobei Trachea, Herz, Thymus und Ösophagus entfernt und die rechte Lunge von der linken getrennt wurde.

Anschließend bestimmte man das Lungenvolumen durch Flüssigkeitsverdrängung (Scherle W 1970). Dabei wurde ein Becherglas mit Wasser auf eine Waage (Kern, Balingen-Frommern, Deutschland) gestellt, mit einer Klemme die jeweils rechte und linke Lunge einer Maus getrennt voneinander vollständig in das Wasser eingetaucht und die entsprechende Wasserverdrängung auf der Waage abgelesen (in [g]).

Nun erfolgte die Einbettung der Lungen in 2%igen Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach der vollständigen Aushärtung wurde der Agar-Lungenblock aus dem Becher gelöst und in einem Schneidegerät (Eigenanfertigung, siehe Abb. 6A) von apikal nach kaudal in 2 mm dicke Scheiben geschnitten (Fehrenbach H 1998). Die Scheibe mit dem ersten Anschnitt wurde verworfen und anschließend nach dem Zufallsprinzip (Würfeln) jeweils abwechselnd für die Einbettung in Araldit bzw.

Technovit ausgewählt (siehe Abb. 6B). Die Reste des Agar wurden abgelöst und die Scheiben erneut in Gläschen mit Fixans gegeben, in denen sie bis zur Einbettung eine Woche verblieben.



**Abbildung 6 Erstellung und Auswahl der Lungenschnitte**

Mit Hilfe des Schneidegerätes (A) lassen sich gleichmäßige Schnitte anfertigen, die anschließend nach dem Zufallsprinzip für die verschiedenen Einbettungen ausgewählt werden (B). Durch Würfeln wird entschieden, ob die erste Scheibe in Araldit (gerade) oder in Technovit (ungerade) eingebettet wird (Fehrenbach H 2008).

## 3.2 Die Aufarbeitung der Proben für die Lichtmikroskopie

### 3.2.1 Die Einbettung in Technovit

Die Einbettung der Scheiben in Technovit 7100 (GMA von Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland) erfolgte über vier Tage. Technovit 7100 ist ein Kunststoffeinfettssystem auf Basis von Hydroxyethyl-Methakrylat (HEMA) und verringert im Gegensatz zu Paraffin den Schrumpfungsprozeß des eingebetteten Materials erheblich (Ladekarl M 1994).

#### 3.2.1.1 Probenaufbearbeitung

Die Proben wurden viermal fünf Minuten lang in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer (Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Zur Postfixierung wurden sie zwei Stunden lang in 1% OsO<sub>4</sub> in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer gegeben und erneut viermal fünf Minuten in Na-Cacodylat-Puffer und danach zweimal fünf Minuten in *Aqua bidest.* (BBraun, Melsungen, Deutschland) gewaschen, in dem sie anschließend noch etwa eine Stunde belassen wurden.

Zur Blockkontrastierung wurden die Proben über Nacht in halbgesättigtes wässriges Uranylazetat (Agar Scientific LTD, Stansted, UK) transferiert und am nächsten Tag erneut viermal fünf Minuten lang mit *Aqua bidest.* gewaschen.

Zur Entwässerung wurden die Proben nun je zweimal eine Stunde lang in 70% und 90% Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) und danach einmal eine Stunde lang in 100% Aceton gegeben und über Nacht in Technovit 7100 mit Härter 1 im Verhältnis 1:1 mit Aceton belassen.

Nun wurden die Proben 20 Minuten bei 400 mbar entgast und dann zur Infiltration über Nacht in Technovit 7100 mit Härter 1 gegeben.

Abschließend wurden die Proben in Teflonformen (Eigenanfertigung) gegeben und mit 1 ml Härter 2 auf 15 ml Infiltrationslösung ausgegossen und aushärten gelassen. Die Blöckchen wurden an einem Rotationsmikrotom (Typ 230 MOT, Reichert und Jung (heute Leica), Heidelberg, Deutschland) in 2 µm dicke Scheiben geschnitten und diese anschließend auf destilliertes Wasser gelegt. Jeweils der erste und der vierte Schnitt wurden auf einen Objektträger (Engelbrecht, Edermünde, Deutschland) aufgezogen. Dieser wurde auf eine Wärmeplatte (Typ HP100, Guwina-Hoffmann-GmbH, Berlin, Deutschland) gelegt und bei 60 °C getrocknet.

### **3.2.2. Färbungen**

#### **3.2.2.1 Richardson-Färbung**

Jeweils ein Objektträger mit zwei Schnitten jeder Lunge wurde mit Richardson (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Hierzu wurde die Farbe über Nacht auf 60 °C erwärmt. Der Objektträger wurde 30 Sekunden lang in die Farbe eingetaucht und das gänzlich blaue Präparat anschließend mit warmem Leitungswasser differenziert, bis sich der das Gewebe umgebende Kunststoff entfärbt und das Präparat eine optimale Farbtintensität erreicht hatte. Danach wurde es noch einmal mit *Aqua dest.* abgespült, kurz in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht und anschließend luftgetrocknet.

Der Objektträger wurde mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

#### **3.2.2.2 Orcein-Färbung**

Zur Darstellung der elastischen Fasern wurde ein weiterer Schnitt mit Orcein (Fluka, Sigma-Aldrich Chem GmbH, Taufkirchen, Deutschland) angefärbt. Hierzu wurden die Schnitte 45 Minuten lang in 1%ige, filtrierte Orcein-Lösung gegeben, danach mit *Aqua dest.* abgespült und anschließend zweimal mit 96%igem Alkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült. Mit 100%igem Ethanol wurden die Schnitte nun differenziert, bis der Hintergrund rosa wurde. Der Schnitt wurde zweimal fünf Minuten lang in Xylol getaucht und anschließend mit Entellan eingedeckt.

### 3.3. Aufarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie

#### 3.3.1 Die Einbettung in Araldit

Für die Elektronenmikroskopie wurden von den hierfür ausgewählten Lungenscheiben Proben nach dem Prinzip der systematischen, gleichförmigen, zufälligen Probenentnahme (*Systematic Uniform Random Sampling*, SURS) entnommen, die dann in Araldit (Kunstharz, Serva, Heidelberg, Deutschland) eingebettet wurden. Hierzu wurden die geschnittenen Scheiben mit einer durchsichtigen Folie bedeckt, auf der Raster-Punkte aufgebracht waren (Abstand der Punkte  $d=5\text{ mm}$ ). An den Stellen, an denen die Punkte auf Parenchym fielen wurde ein kleiner Würfel (Kantenlänge ca. 3 mm) herausgeschnitten. Die Aufarbeitung der Parenchymproben wird im Folgenden beschrieben.

##### 3.3.1.1 Probenaufarbeitung

Die Proben wurden viermal fünf Minuten lang in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer gewaschen und anschließend zwei Stunden lang zur Postfixierung in 1%  $\text{OsO}_4$  in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer gegeben, erneut vier mal fünf Minuten in Na-Cacodylat-Puffer und zweimal fünf Minuten in *Aqua bidest.* gewaschen. Darin verblieben sie anschließend noch etwa eine Stunde.

Danach erfolgte eine Blockkontrastierung über Nacht bei Raumtemperatur in 3%iger wässriger Tanninsäure-Lösung (pH 7,0) (Mallinckrodt, Parls, Kentucky, USA) zur Darstellung der elastischen Fasern (Haidar A 1992). Danach wurden die Proben viermal fünf Minuten lang in *Aqua bidest.* gewaschen und darin dann etwa eine Stunde belassen.

Anschließend wurden sie entwässert und dabei zunächst zwei mal zehn Minuten in 70%iges, 90%iges und 100%iges Aceton gegeben und dann eine Stunde in einem 1:1 Gemisch von Aceton und Araldit belassen. Nach der Entgasung (20 Minuten bei 400 mbar) wurden die Proben über Nacht in Araldit gegeben.

Die infiltrierten Gewebeblöckchen wurden auf einen mit Parafilm (American National Can., Greenwich, CT, USA) überzogenen Objektträger transferiert, eine Gelatine kapsel mit Araldit aufgefüllt und dann über die Gewebeprobe gestülpt und zur Wärmepolymerisation auf 60°C erhitzt.

Die so entstandenen Blöckchen wurden mit 35°C warmem Wasser aus der Gelatine kapsel herausgelöst und das Blöckchen getrimmt, das heißt, das überschüssige Araldit wurde mit einer Rasierklinge entfernt, bis eine trapezförmige Spitze entstand.



### 3.3.2 Anfertigung der Schnitte

Das Präparat wurde in ein Ultramikrotom (Typ Ultracut E, Leica, Wetzlar, Deutschland) eingespannt. Mit einem Diamantmesser wurden ca. 1 µm dicke Semidünnschnitte hergestellt, die auf einen Objektträger aufgezogen und nach Richardson gefärbt wurden. Lichtmikroskopisch wurde ausgewählt, welches Areal des Präparates sich eignete, um einen Ultradünnschnitt anzufertigen. Das Blockchen wurde so getrimmt, dass das entsprechende Areal trapezförmig vorstand und am Ultramikrotom wurden 90 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt.

Diese ultradünnen Schnitte wurden auf mit Formvar (Serva, Heidelberg, Deutschland) beschichtete Nickelnetze (MAXTAFORM HF 35 Ni, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen.

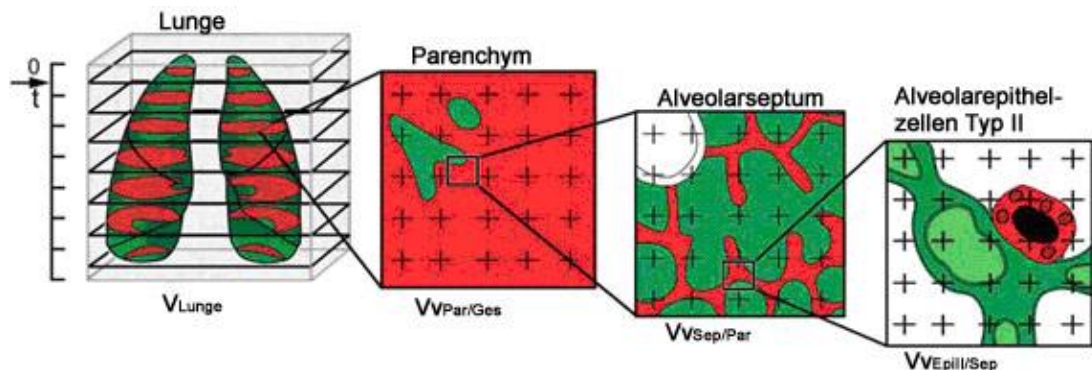
Die Präparate wurden mit Uranylazetat und Bleizitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) kontrastiert. Hierzu wurde zunächst eine Petrischale mit Parafilm ausgelegt, auf diesen das Uranylazetat aufgetropft und die einzelnen Netze (*Grids*) mit der Schichtseite nach unten schwimmend auf den Tropfen gelegt. Nachdem sie acht Minuten lichtgeschützt inkubierten, wurden sie kurz mit *Ampuwa* (BBraun, Melsungen, Deutschland) abgespült und auf Tropfen mit *Ampuwa* abgelegt. Nachdem der Vorgang mit allen Präparaten durchgeführt worden war, wurden die Netze in *Ampuwa* gespült, das Wasser mit Filterpapier abgetupft, über einen Tropfen mit Bleizitrat gezogen und erneut abgetupft. Danach inkubierten sie fünf Minuten auf einem Bleizitratropfen. Anschließend wurden die *Grids* gespült und dann in einer *Grid-Box* (Leica, Wetzlar, Deutschland) abgelegt. Sie trockneten dort 30 Minuten, bis die Box verschlossen werden konnte.

## 3.4 Quantitative Strukturanalyse

Für die quantitative Untersuchung der Lunge wurden sogenannte „design-basierte“ Verfahren der Stereologie eingesetzt (Fehrenbach H 1998; Ochs M 2006).

Die Stereologie ist ein Teilgebiet der stochastischen Geometrie und gilt als anerkanntes Verfahren, um strukturelle Veränderungen von Zellen oder deren Organellen zu quantifizieren. Die entwickelten Methoden erlauben es, anhand der in der Mikroskopie vorliegenden zweidimensionalen Schnitte quantitative Aussagen über die Volumina, die Oberflächen oder Partikelanzahlen von sich im dreidimensionalen Raum erstreckenden Strukturen treffen zu können.

Gültig sind diese Daten nur, wenn die Proben repräsentativ für das gesamte Organ sind. Dies wird durch das Prinzip des SURS gewährleistet (Howard CV 1998). Hierbei beginnt man an der Außenseite der Probe bei einem zufällig gewählten Punkt, der dann aber die Position aller weiteren bestimmt. Diese Kette der Probenentnahme muss auf allen Ebenen der Kaskade von Probenentnahmen eingehalten werden (siehe Abb. 7).



**Abbildung 7 Kaskade der Probenentnahme**

Illustration der Probenentnahme in Kaskaden am Beispiel von Alveolarepithelzellen Typ II. Auf jeder Ebene muss das Prinzip des SURS angewendet werden. Auf makroskopischer Ebene wird die Lunge vollständig horizontal in Scheiben der Dicke  $t$  geschnitten. Der Anfangspunkt liegt zufällig zwischen 0 und  $t$  (Pfeil). Diese Gewebescheiben können nun zur Entnahme von Proben für die Licht- und Elektronenmikroskopie genutzt werden. Bei niedriger Vergrößerung wird der Volumenanteil des Parenchyms am Lungenvolumen ( $VV_{Par/Ges}$ ) durch das Zählen von auf das Parenchym entfallenden Testpunkten ermittelt. Der Volumenanteil des Alveolarseptums am Parenchym wird in mittlerer lichtmikroskopischer Vergrößerung bestimmt. Der Volumenanteil der Alveolarepithelzellen II am Alveolarseptum kann in mittlerer elektronenmikroskopischer Vergrößerung ermittelt werden. Das absolute Volumen von Alveolarepithelzellen II ( $V_{Epil}$ ) kann dann berechnet werden aus  $V_{Epil} = V_{Lunge} \times VV_{Par/Ges} \times VV_{Sep/Par} \times VV_{Epil/Sep}$  (Ochs M 2006).

### 3.4.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Um die absoluten Volumina der Septen zu bestimmen, wurden Auswertungen am Lichtmikroskop (Typ BX 51, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde das jeweilige Bild des histologischen Schnittes über eine Videokamera auf einen Computermonitor übertragen und konnte dort mit einer für stereologische Anwendungen konzipierten Software (*Computer Assisted Stereological Toolbox*, C.A.S.T.-Grid Version 2.1, Olympus, Albertslund, Dänemark) online ausgewertet werden. Im Weiteren wurde schrittweise wie folgt vorgegangen:

### 3.4.1.1 Die Ermittlung des Parenchymvolumens

An den mit Richardson gefärbten Schnitten (siehe Abb. 8, Färbung siehe Kapitel 3.2.2.) wurden zunächst Parenchym und nichtparenchymatöse Strukturen wie Bronchien, Gefäße und Pleura sowie der Lunge noch anhaftendes Gewebe wie Fett unterschieden.

Mit dem zuvor durch Wasserverdrängung bestimmten Gesamtvolumen ( $V_{\text{Ges}}$ ) wurde zunächst nach Abzug der Strukturen, die nicht zur Lunge gehörten (Fett etc.) das Lungenvolumen ( $V_{\text{Lunge}}$ ) berechnet (Formel 1-2).

$$V_{\text{Lunge}} = V_{\text{Ges}} - V_{\text{N-Lunge}} \quad (1)$$

$$V_{\text{N-Lunge}} = \text{Punkte}_{(\text{N-Lunge})} / \text{Punkte}_{(\text{Gesamt})} \times V_{\text{Ges}} \quad (2)$$

Mit Hilfe des Lungenvolumens konnte nun die Volumendichte des Parenchyms am Gesamtvolumen ( $V_{\text{vPar/Lunge}}$ ) bestimmt werden (Formel 3).

$$V_{\text{vPar/Lunge}} = \text{Punkte}_{(\text{Parenchym})} / \text{Punkte}_{(\text{Gesamt})} \quad (3)$$

Nun konnte das absolute Parenchymvolumen ( $V_{\text{Par}}$ ) berechnet werden (Formel 4).

$$V_{\text{Par}} = V_{\text{vPar/Lunge}} \times V_{\text{Lunge}} [\text{mm}^3] \quad (4)$$

### 3.4.1.2 Die Bestimmung der Septumanteile

Im nächsten Schritt wurden an den nach Richardson gefärbten Schnitten die Volumendichten von Luftraum, Septengewebe und Kapillarlumen bestimmt (siehe Abb. 9).

Es wurden zunächst die Volumendichten (hier am Beispiel für die Volumendichte des Septums am Gesamtvolumen ( $V_{\text{vSep/Lunge}}$ ) ermittelt (Formel 5).

$$V_{\text{vSep/Lunge}} = \text{Punkte}_{(\text{Septum})} / \text{Punkte}_{(\text{Gesamt})} \quad (5)$$

Und hieraus wurde das absolute Volumen des Septengewebes ( $V_{\text{Sep}}$ ) berechnet (Formel 6).

$$V_{\text{Sep}} = V_{\text{vSep/Lunge}} \times V_{\text{Par}} [\text{mm}^3] \quad (6)$$

Entsprechend wurde bei der Berechnung von Luftraum und Kapillarlumen verfahren.

### 3.4.1.3 Unterscheidung zwischen Ductus- und Alveolarraum

Der Luftraum wurde differenziert in Alveolarraum und Ductus alveolares. Dazu wurden die mit Orcein gefärbten Schnitte verwendet (siehe Abb. 10, Färbung siehe Kapitel 3.2.2.), da bei diesen die elastischen Fasern dargestellt werden, die sich in besonders hoher Dichte in den Alveolarendknöpfchen befinden. Diese begrenzen den Eingang in die Alveolen, und somit hilft ihre Darstellung bei der Unterscheidung zwischen Ductus und Alveole.

### 3.4.1.4 Bestimmung von Alveolaroberfläche, mittlerer Dicke der Alveolarsepten, *Mean Face Length* und *Mean Chord Length*

Im nächsten Schritt der Auswertung wurden die Oberflächendichte bzw. die Gesamtoberfläche der Lunge sowie die *Mean Face Length* gemeinsam ausgewertet.

Für die Bestimmung der Gesamtalveolaroberflächendichte ( $Sv_a$ ) und der Gesamtalveolaroberfläche ( $S_a$ ) wurden die Durchtrittspunkte der Testlinien durch die von Alveolarepithel bedeckten Septen und durch Alveolarepithel, das Bestandteile des Nicht-Parenchyms überzogen, gezählt (siehe Abb. 11). Die Oberflächendichte der freien Alveolarsepten ( $Sv_{alv}$ ), sowie die Oberfläche der freien Alveolarsepten ( $S_{alv}$ ) wurden ebenfalls berechnet (Formeln 7-10).

Gesamtalveolaroberflächendichte:

$$Sv_a = (2 \times (I_{Sept} + I_{Par})) / (\text{Punkte}_{(Parenchym)}) \times (1/L_P) [\mu m^2/\mu m^3] \quad (7)$$

Gesamtalveolaroberfläche:

$$S_a = Sv_a \times V_{Par} [cm^2] \quad (8)$$

Oberflächendichte freie Alveolarsepten:

$$Sv_{alv} = 2 \times I_{Sept} / \text{Punkte}_{(Parenchym)} \times (1/L_P) [\mu m^2/\mu m^3] \quad (9)$$

Oberfläche freie Alveolarsepten:

$$S_{alv} = Sv_{alv} \times V_{Par} [cm^2] \quad (10)$$

$V_{Par}$  wurde hier aus bereits vorher ermittelten Daten entnommen.  $L_P$  (Testlinienlänge pro Punkt, *Length per point*) wurden von der Software C.A.S.T automatisch berechnet und konnten abgelesen werden. Die Oberflächendichte entspricht der Oberfläche pro Volumeneinheit Parenchym.

Aus den zuvor ermittelten Volumina der Alveolarsepten sowie aus der Gesamtalveolaroberfläche konnte die arithmetische mittlere Dicke der Alveolarsepten ( $\tau$ ) berechnet werden (Formel 11).

$$\tau = V_{\text{Sep}} / S_a [\mu\text{m}] \quad (11)$$

Für die Bestimmung der *Mean Face Length* wurden die *Triple Points* gezählt sowie die einzelnen Endknöpfchen. Berechnet wurde die *Mean Face Length* aus der Oberflächendichte (bestimmt im vorherigen Schritt) und aus der Längendichte der *Triple Points* (*Length density of triple points,  $Lv_t$* ) und der Längendichte der Endknöpfchen (*Length density of end points,  $Lv_e$* ) (Formeln 12-14). Die  $A_p$  (Fläche pro Testpunkt, *Area per point*) wurde von der Software C.A.S.T automatisch berechnet und konnte abgelesen werden.

*Mean Face Length:*

$$\lambda = \pi S_v / (3 * Lv_t + Lv_e) [\mu\text{m}] \quad (12)$$

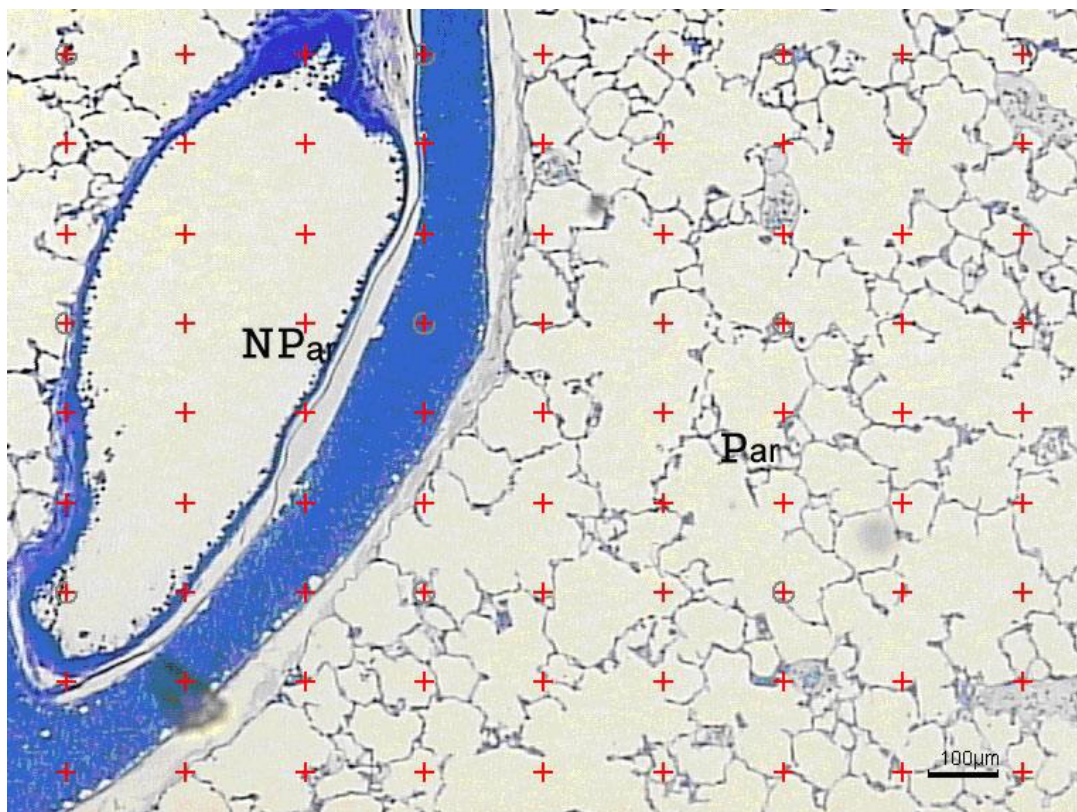
$$Lv_t = 2 * TP / \text{Punkte(Parenchym)} * A_p \quad (13)$$

$$Lv_e = 2 * EK / \text{Punkte(Parenchym)} * A_p \quad (14)$$

(Methode nach Hyde DM, persönliche Mitteilung)

Als Maß für die mittlere freie Weglänge der Gasaustauschräume (Ductus- und Alveolarräume) wurde die *Mean Chord Length* ( $L_{cm}$ ) an Richardson gefärbten Schnitten (Färbung siehe Kapitel 3.2.2.) bestimmt. Hierzu wurden bei einer Vergrößerung von x 853 die Durchtritte der Testlinien durch das Septum sowie die Anzahl der auf den Luftraum fallenden Testpunkte ermittelt. Daraus wurde die  $L_{cm}$  berechnet (Formel 15).

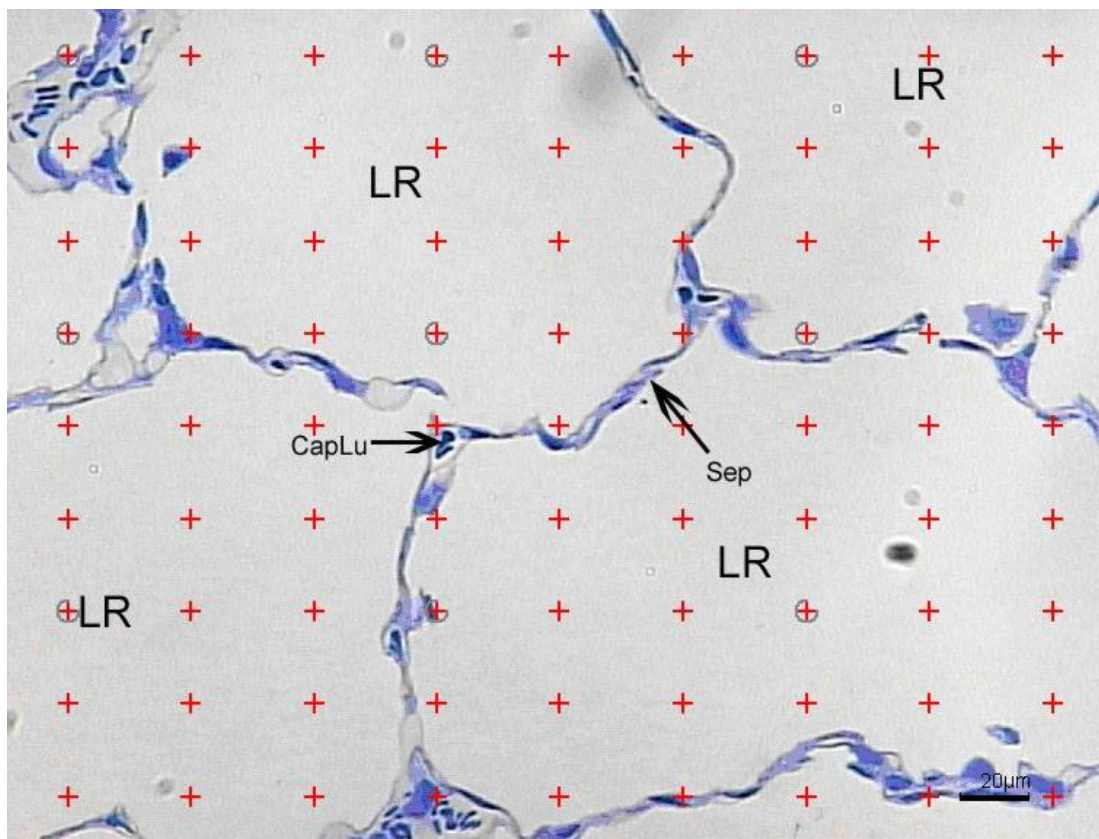
$$L_{cm} = \text{Punkte}_{(\text{Luft})} \times L_P / (l_{\text{Sept}} / 2) [\mu\text{m}] \quad (15)$$



**Abbildung 8 Auswertung von Parenchym/Nicht-Parenchym der Lungen an einem Richardson gefärbten Schnitt**

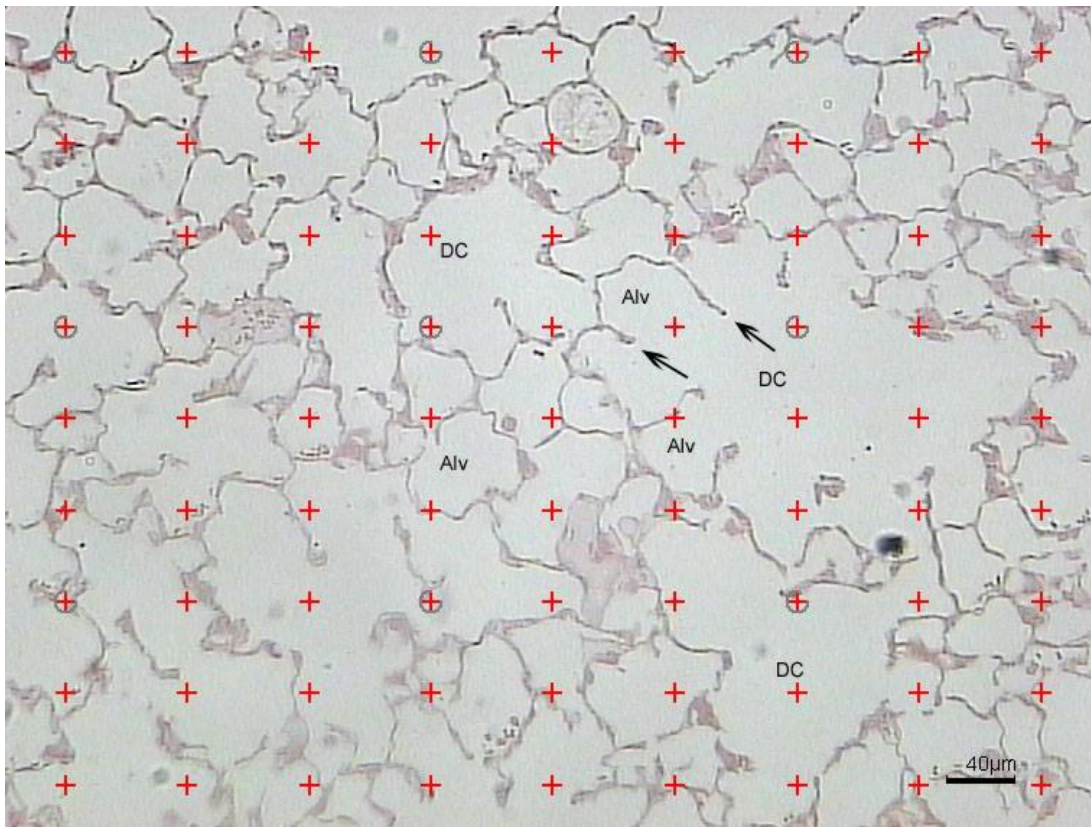
Darstellung der Auswertung von Parenchym (Par) und Nicht-Parenchym (NPar) an einem lichtmikroskopischen Schnitt einer männlichen C3H/HeJ-Maus. Gezählt wurden die Testpunkte (rote Kreuze), die auf die jeweilige Strukturkomponente fielen.





**Abbildung 9 Auswertung von Septengewebe, Luftraum- und Kapillarlumenvolumina der Lungen an einem Richardson gefärbten Schnitt**

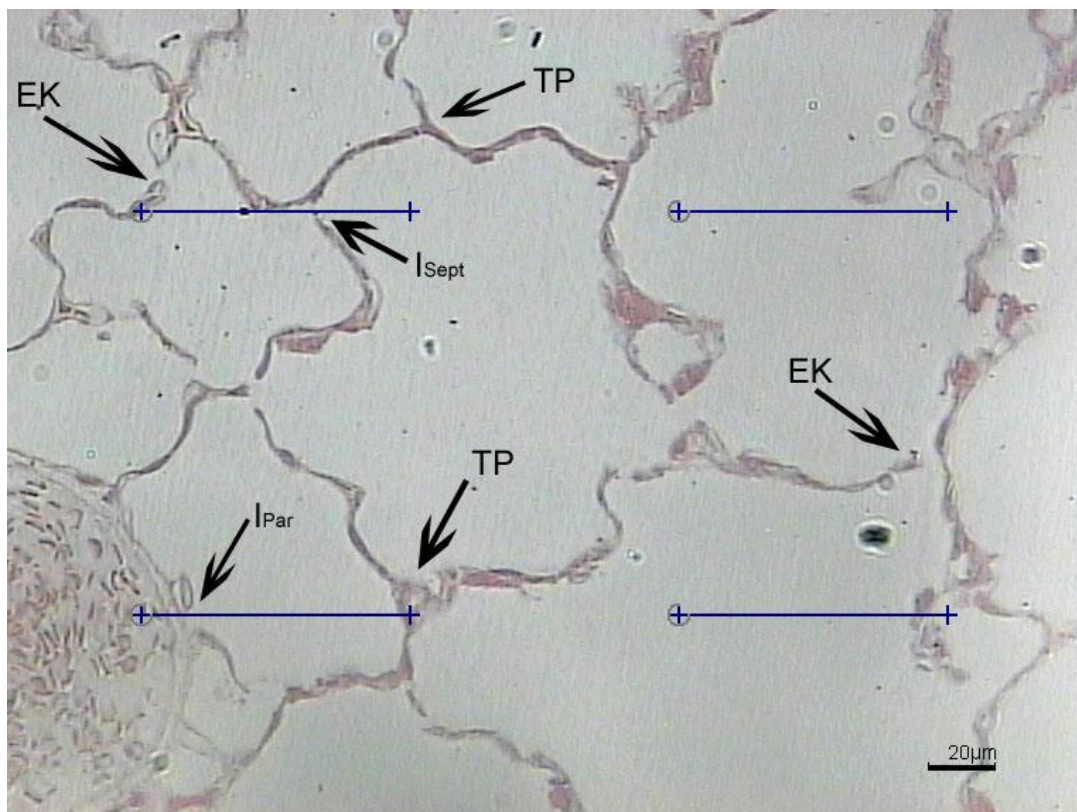
Darstellung der Auswertung von Septengewebe (Sep), Luftraum (LR) und Kapillarlumen (CapLu) an einem lichtmikroskopischen Schnitt der Lunge einer männlichen C3H-Maus. Das Volumen von Septengewebe und Kapillarlumina wurde ermittelt, indem die Testpunkte (rote Kreuze) gezählt wurden, die auf die jeweiligen Kompartimente fielen. Für den Luftraum wurde die Anzahl der mit dem grauen Halbkreis umgebenen Testpunkte ausgezählt und diese Zahl dann mit neun multipliziert, da sie dann der Zahl der roten Kreuze entsprachen und somit die verschiedenen Kompartimente vergleichbar wurden.



**Abbildung 10 Bestimmung der Anteile von Ductuli und Alveolen am Luftraumvolumen an einem Orcein gefärbten Schnitt**

Beispiel zur Bestimmung von Ductal- und Alveolarraum anhand eines lichtmikroskopischen Schnittes der Lunge einer männlichen JF1-Maus. Es wurden die Testpunkte (rote Kreuze) gezählt, die auf den Ductalraum (DC) bzw. auf den Alveolarraum (Alv) entfielen. Die Auswertung wurde an Orcein gefärbten Schnitten durchgeführt, da hierbei die elastischen Fasern besonders stark angefärbt wurden und somit der Eingang der Alveolen, der durch die Endknöpfchen begrenzt wird, deutlicher zu erkennen war. Die Pfeile deuten auf zwei Endknöpfchen am Eingang einer Alveole.





**Abbildung 11 Bestimmung von Oberflächendichte und Oberfläche des Alveolarepithels sowie Bestimmung der *Mean Face Length* an einem Orcein gefärbten Schnitt**

Zur Bestimmung der Oberflächendichte der Lunge wurden die Ein- und Austrittspunkte der Linien in das Septum ( $I_{\text{Sept}}$ ) und in das Parenchym ( $I_{\text{Par}}$ ) anhand eines lichtmikroskopischen Schnittes bestimmt. Zur Berechnung der *Mean Face Length* wurde die Anzahl der Septenkreuzungspunkte (*Triple Points*, TP) bestimmt sowie die Anzahl der Endknöpfchen (EK). Die Abbildung stammt von einer weiblichen CH-Maus.

### 3.4.2 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Analyse der ultrastrukturellen Parameter erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop Typ EM 900 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Hierbei wurden die Volumendichten der verschiedenen Bestandteile der Alveolarsepten bestimmt.

Das elektronenmikroskopische Bild wurde auf einen Monitor (Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland) projiziert. Die Ausgangsvergrößerung am Mikroskop betrug  $\times 4.400$ , mit Hilfe eines Kalibrierungsrasters wurde die Endvergrößerung auf dem Monitor auf  $\times 60.632$  bestimmt. Auf dem Monitor war ein Punkteraster der Größe A3 mit  $10 \times 14$  Punkten aufgebracht. Nun konnte bestimmt werden, wie viele Testpunkte jeweils auf die einzelnen Komponenten der Alveolarsepten, Kapillarendothel, Alveolarepithelzellen (Typ I und II), Interstitium sowie die extrazellulären Fasern Kollagen und Elastin entfielen. Aus dem Verhältnis der Testpunkte, die auf eine Komponente fielen, zur Gesamtpunktzahl auf Septengewebe konnte die Volumendichte der jeweiligen Komponente bestimmt werden, hier am Beispiel des Volumenanteils von Endothel ( $V_{V_{\text{Endo/Sep}}}$ ) berechnet (Formel 16).

$$V_{V_{\text{Endo/Sep}}} = \text{Punkte}_{(\text{Endothel})} / \text{Punkte}_{(\text{Gesamt})} \quad (16)$$

Entsprechend wurden die Volumendichten für Alveolarepithelzellen Typ I und II, Interstitium, Kollagen und Elastin berechnet.

### 3.4.3 Berechnung der absoluten Volumina

Unter Einbeziehung der zuvor elektronenmikroskopisch bestimmten Volumendichten der Komponenten des Septengewebes sowie des lichtmikroskopisch bestimmten absoluten Volumens der Alveolarsepten wurden die absoluten Volumina für alle Komponenten berechnet, hier am Beispiel des Endothelvolumens ( $V_{\text{Endo}}$ ) (Formel 17).

$$V_{\text{Endo}} = V_{V_{\text{Endo}}} \times V_{\text{sep}} [\text{mm}^3] \quad (17)$$

Auf gleiche Weise wurden die Werte für Alveolarepithelzellen Typ I und II, Interstitium, Kollagen und Elastin bestimmt.

### 3.5 Explorative statistische Datenauswertung

Die Daten der einzelnen Gruppen wurden als arithmetischer Mittelwert ( $\pm 1$  Standardabweichung) aller Individuen einer Gruppe im Ergebnisteil angegeben und graphisch dargestellt.

Die statistische Analyse der quantitativ erhobenen Daten wurde unter Verwendung der Software SigmaStat (Version 2.0) durchgeführt. Sofern Normalität und Varianzgleichheit gegeben waren ( $p > 0,1$ ), wurde mit Hilfe der Zwei-Wege-Varianzanalyse (*Two-way-analysis-of-variance*, Two-way-ANOVA) und des Tukey-Testes zum *posthoc* Mehrfachvergleich (Romanoski J 2002) die jeweiligen Gruppen auf signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) hinsichtlich der Faktoren Spezies und Geschlecht geprüft.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Allgemeines

Die elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Auswertung erfolgte an den Lungen weiblicher und männlicher Mäuse der Inzucht-Stämme C3H und JF1 ( $n = 6$  pro Gruppe). Das Alter der Mäuse lag zwischen 12 und 14 Wochen. Die Tiere des C3H-Stammes waren mit einem Körpergewicht der männlichen Mäuse von  $32,0 \pm 1,4$  g und der weiblichen Mäuse von  $22,6 \pm 0,8$  g deutlich schwerer als die Tiere des JF1-Stammes mit einem Körpergewicht der männlichen Mäuse von  $16,6 \pm 0,9$  g und der weiblichen Mäuse von  $14,6 \pm 1,6$  g. Die Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Tieren der Stämme und zwischen den Geschlechtern waren signifikant.

Die Lungenvolumina der C3H-Mäuse waren größer als die der JF1-Mäuse (zur Bestimmung siehe Kapitel 3.1). Die männlichen C3H-Mäuse hatten ein Lungenvolumen von  $1092 \pm 123$  mm<sup>3</sup>, die weiblichen C3H-Mäuse von  $987 \pm 54$  mm<sup>3</sup>. Das Lungenvolumen der männlichen JF1-Mäuse betrug  $735 \pm 71$  mm<sup>3</sup>, das der weiblichen  $667 \pm 23$  mm<sup>3</sup>. Die Unterschiede zwischen den Stämmen war signifikant, zwischen den Geschlechtern zeigte sich nur ein signifikanter Geschlechtsunterschied innerhalb des C3H-Stammes.

Da das Körpergewicht der Mäuse des C3H-Stammes deutlich größer war und auch die männlichen Mäuse schwerer waren als die weiblichen Mäuse, werden die Daten im folgenden stets als absolute Werte sowie als massenspezifische, auf das Körpergewicht bezogene Werte dargestellt.

Das Lungenvolumen bezogen auf das Körpergewicht ergab für die männlichen Mäuse des C3H-Stammes  $34,1 \pm 4,0$  mm<sup>3</sup>/g, für die weiblichen Mäuse  $43,7 \pm 2,8$  mm<sup>3</sup>/g, für die männlichen Mäuse des JF1-Stammes  $44,3 \pm 4,5$  mm<sup>3</sup>/g und für die weiblichen Mäuse  $46,1 \pm 3,9$  mm<sup>3</sup>/g. Signifikant waren die Unterschiede zwischen den männlichen Mäusen der beiden Stämme und zwischen den Geschlechtern des C3H-Stammes.

Die vorausgehend dargestellten Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Tabelle 2 zeigt die Signifikanzen der dargestellten Werte.

Zu jedem inhaltlichen Abschnitt sind die Signifikanzen jeweils tabellarisch zusammengefasst. Eine Zusammenfassung der aller signifikanten Ergebnisse befindet sich in Tabelle 19 am Ende des Ergebnisteils.

**Tabelle 1 Basisdaten zu den Mäusen der Stämme C3H und JF1**

	<b>C3H/HeJ m</b>	<b>C3H/HeJ w</b>	<b>JF1/Msf m</b>	<b>JF1/Msf w</b>
<b>Tierzahl [n]</b>	6	6	6	6
<b>Alter [Wochen]</b>	13	13	12-14	12-14
<b>Körpergewicht [g]</b>	32,0 ± 1,4	22,6 ± 0,8	16,6 ± 0,93	14,6 ± 1,6
<b>Lungenvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	1092 ± 123	987 ± 54	735 ± 71	667 ± 23
<b>Massenspezif. Lungenvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	34,1 ± 4,0	43,7 ± 2,8	44,3 ± 4,5	46,1 ± 3,9

Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung

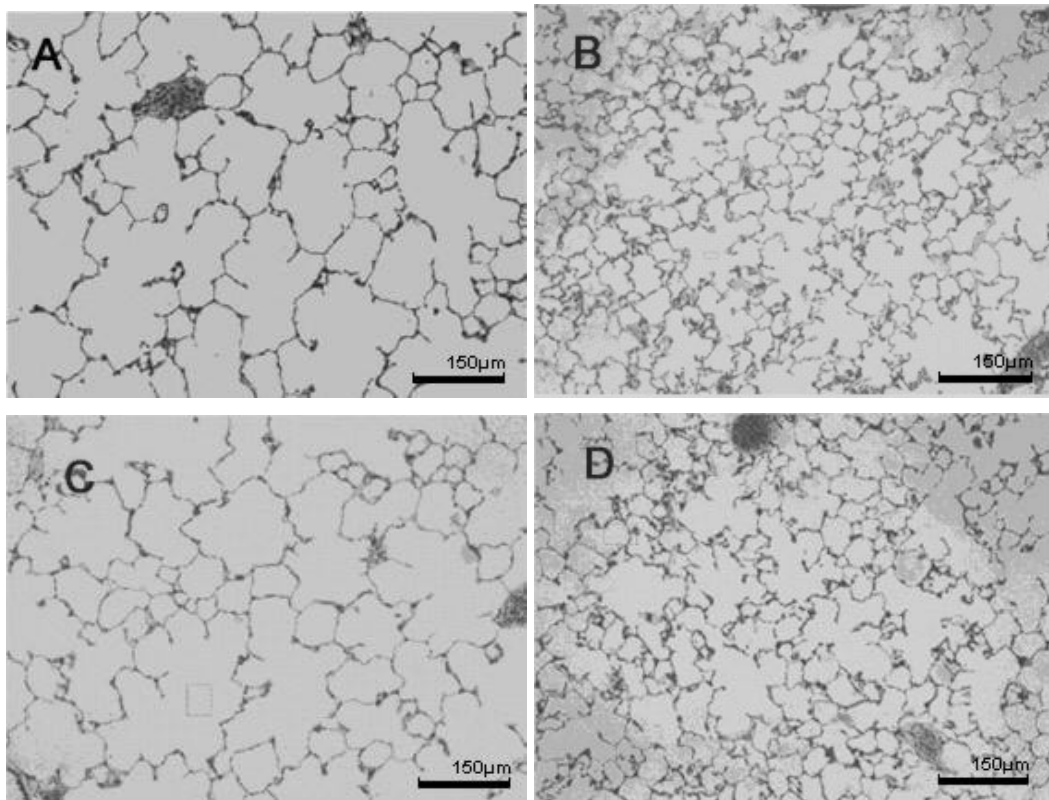
**Tabelle 2 Signifikanzen von Körpergewicht und Lungenvolumen der C3H- und JF1-Mäuse**

	<b>C3H vs. JF1</b>	<b>m vs. w</b>	<b>m vs. w in C3H</b>	<b>m vs. w in JF1</b>	<b>Stamm in m</b>	<b>Stamm in w</b>
<b>Körpergewicht [g]</b>	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P=0,009	P<0,001	P<0,001
<b>Lungenvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	P<0,001	P=0,012	P=0,028	ns	P<0,001	P<0,001
<b>Massenspezif. Lungenvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P<0,001	P=0,002	P<0,001	ns	P<0,001	ns

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant

## 4.2 Lichtmikroskopie

In der lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahme stellten sich die Lungen der beiden Mausstämmen unterschiedlich dar. Die Alveolarräume der JF1-Mäuse waren deutlich kleiner, das Verhältnis von Septen zu Luftraum erschien im Vergleich zu den Lungen der C3H-Mäuse zugunsten der Septen verschoben (siehe Abb. 12). Dies bestätigte sich auch bei der quantitativen Erfassung der verschiedenen Lungenparameter.



**Abbildung 12 Lichtmikroskopische Übersicht über das Parenchym der Lungen von C3H- und JF1-Mäusen**

Die Bilder zeigen lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen der Lungen der Mausstämmen A) C3H männlich B) JF1 männlich C) C3H weiblich D) JF1 weiblich

#### 4.2.1 Das Lungenvolumen

Das Lungenvolumen wurde unterschieden in Parenchym und nichtparenchymatöse Anteile (siehe Kapitel 3.4.1.1). Der C3H-Stamm hatte hierbei Parenchymvolumina von  $933 \pm 112 \text{ mm}^3$  bei den männlichen und  $849 \pm 71 \text{ mm}^3$  bei den weiblichen Mäusen, das Parenchymvolumen des JF1-Stammes war deutlich kleiner,  $629 \pm 72 \text{ mm}^3$  bei den männlichen und  $571 \pm 28 \text{ mm}^3$  bei den weiblichen Tieren (siehe Abb. 13A). Der Unterschied zwischen den Stämmen war hierbei signifikant, sowohl beim Vergleich der weiblichen als auch der männlichen Tiere. Ein Geschlechtsunterschied bestand nicht (siehe Tabelle 3).

Die nichtparenchymatösen Anteile betrugen bei den männlichen C3H-Mäusen  $145 \pm 33 \text{ mm}^3$  und bei den weiblichen  $126 \pm 22 \text{ mm}^3$  sowie  $98 \pm 23 \text{ mm}^3$  bei den männlichen und  $78 \pm 11 \text{ mm}^3$  bei den weiblichen Mäusen des JF1-Stammes, die Unterschiede zwischen den Stämmen waren signifikant zwischen den männlichen und zwischen den weiblichen Mäusen der Stämme, nicht jedoch zwischen den Geschlechtern.

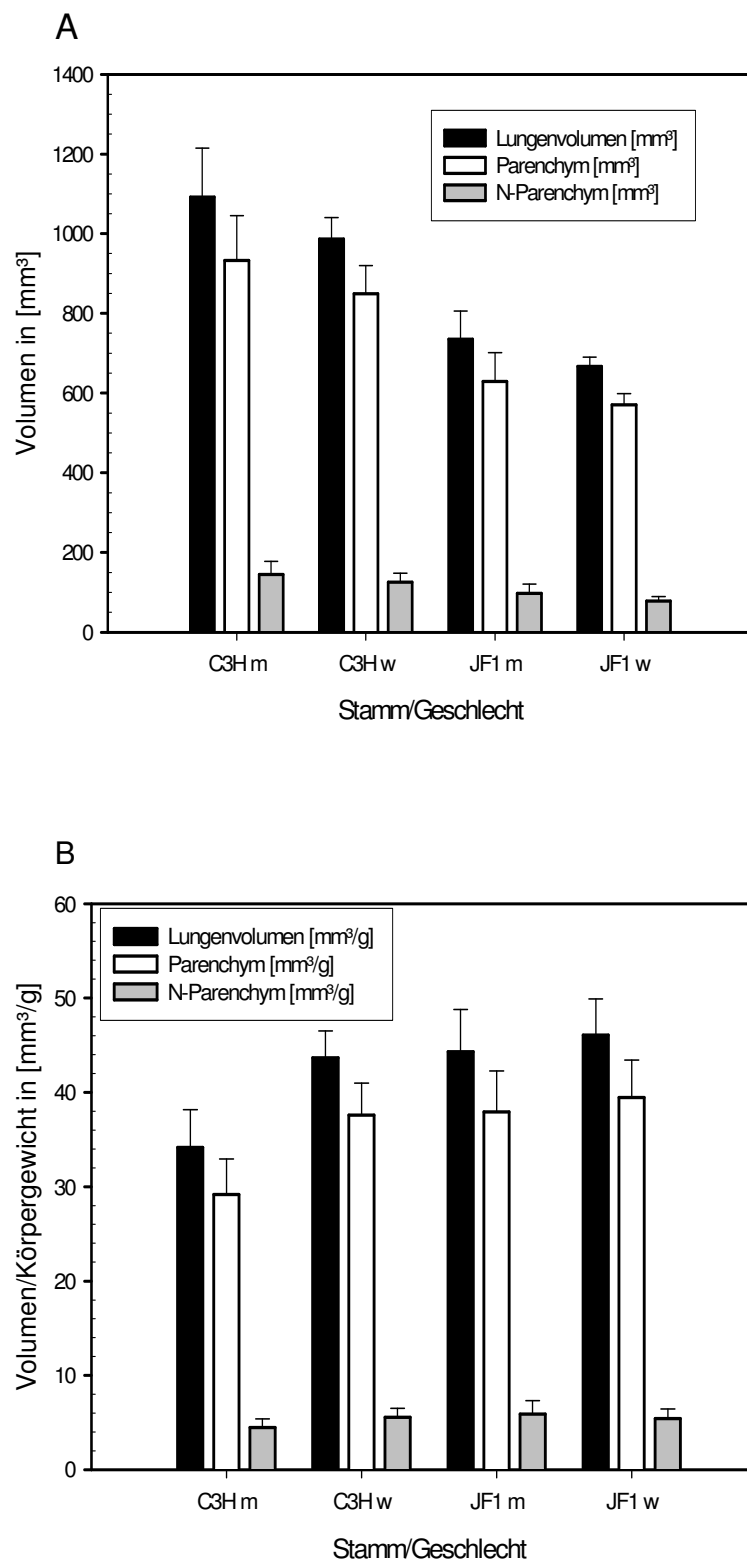
Bei der Normierung des Parenchyms auf das Körpergewicht stellten sich die Ergebnisse genau anders herum dar (siehe Abb. 13B). Die C3H-Mäuse hatten mit  $29,2 \pm 3,8 \text{ mm}^3/\text{g}$  bei den männlichen und  $37,6 \pm 3,4 \text{ mm}^3/\text{g}$  bei den weiblichen Tieren geringere massenspezifische Parenchymvolumina als die JF1-Mäuse mit  $37,9 \pm 4,3 \text{ mm}^3/\text{g}$  bei den männlichen und  $39,5 \pm 4,0 \text{ mm}^3/\text{g}$  bei den weiblichen Tieren. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen. Bei näherer Differenzierung zeigte sich allerdings, dass er nur zwischen den männlichen Mäusen der beiden Stämme bestand, nicht jedoch zwischen den weiblichen Mäusen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich auch zwischen den Geschlechtern des C3H-Stammes (siehe Tabelle 3).

Die nichtparenchymatösen Lungenanteile wiesen bei Normierung auf das Körpergewicht keine signifikanten Unterschiede auf. Sie betrugen  $4,5 \pm 0,9 \text{ mm}^3/\text{g}$  für die männlichen C3H-Mäuse und  $5,6 \pm 0,9 \text{ mm}^3/\text{g}$  für die weiblichen. Für die JF1-Mäuse betrugen sie  $5,9 \pm 1,4 \text{ mm}^3/\text{g}$  bei den männlichen und  $5,4 \pm 1,0 \text{ mm}^3/\text{g}$  bei den weiblichen Tieren.

**Tabelle 3** Signifikanzen der Volumina von Parenchym und Nicht-Parenchym der C3H- und JF1-Mäuse

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b>Parenchym-volumen [mm<sup>3</sup>]</b>	P<0,001	P=0,035	ns	ns	P<0,001	P<0,001
<b>Nicht-Parenchym-volumen [mm<sup>3</sup>]</b>	P<0,001	ns	ns	ns	P=0,002	P=0,003
<b>Massenspezif. Volumen Parenchym [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,003	P=0,005	P=0,001	ns	P=0,001	ns
<b>Massenspezif. Volumen Nicht-Parenchym [mm<sup>3</sup>/g]</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant



**Abbildung 13 Das Lungenvolumen der C3H- und JF1-Mäuse**

A) Die Volumina von Parenchym und Nicht-Parenchym B) Die massenspezifischen, auf das Körpergewicht bezogenen Volumina von Parenchym und Nicht-Parenchym.



#### 4.2.2 Das Lungenparenchym

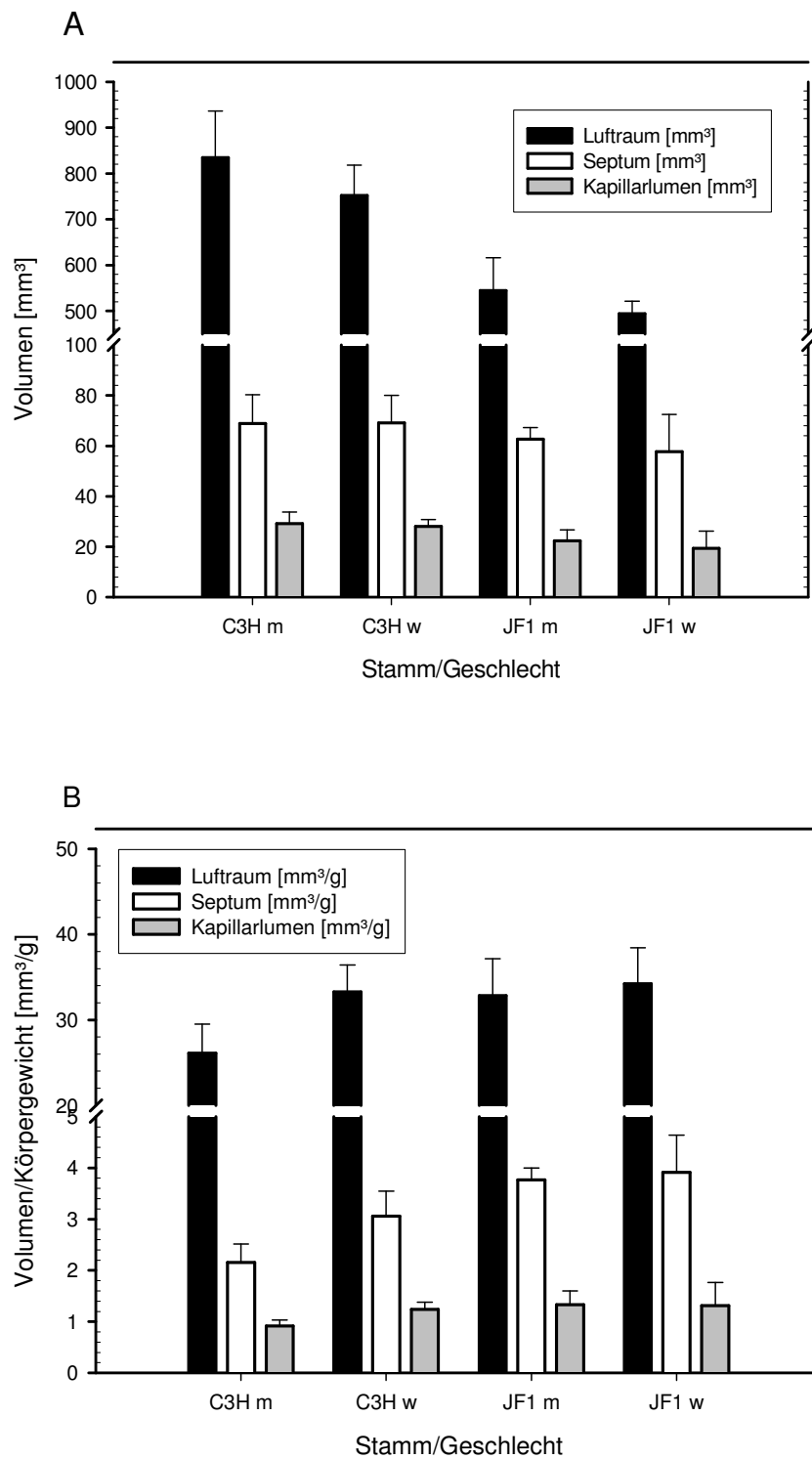
Das Parenchym gliedert sich in Kapillarlumen, Luftraum und Septum (siehe Kapitel 3.4.1.2). Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte der Volumina von Luftraum, Septen und Kapillarlumina. In Abb. 14A sind diese Daten graphisch dargestellt. Abb. 14B gibt die Volumina von Luftraum, Septum und Kapillarlumen bezogen auf das Körpergewicht an.

**Tabelle 4 Die Volumina des Lungenparenchyms der C3H- und JF1-Mäuse**

	<b>C3H m</b>	<b>C3H w</b>	<b>JF1 m</b>	<b>JF1 w</b>
<b>Luftraumvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	834 ± 102	752 ± 66	544 ± 72	494 ± 27
<b>Septenvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	69 ± 12	69 ± 11	63 ± 5	58 ± 5
<b>Kapillarlumen-volumen [mm<sup>3</sup>]</b>	29,2 ± 4,5	28,0 ± 2,8	22,3 ± 4,4	19,3 ± 6,9
<b>Massenspezif. Luftraumvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	26,1 ± 3,4	33,3 ± 3,1	32,8 ± 4,3	34,2 ± 4,2
<b>Massenspezif. Septenvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	2,16 ± 0,36	3,06 ± 0,49	3,77 ± 0,23	3,92 ± 0,72
<b>Massenspezif. Kapillarlumen-volumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	0,92 ± 0,12	1,24 ± 0,14	1,33 ± 0,27	1,31 ± 0,45

Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung

Signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen (sowohl zwischen männlichen als auch zwischen weiblichen Tieren) zeigten sich bei den Kapillarlumina und dem Luftraum, nicht jedoch bei den Septen. Nach der Körpergewichtsnormierung bestanden signifikante Stamm-Unterschiede zwischen den männlichen Mäusen in allen drei Anteilen, zwischen den weiblichen Mäusen nur beim Septum. Bei Luftraum und Septum zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern innerhalb des C3-Stammes (siehe Tabelle 5).



**Abbildung 14 Das Volumen des Lungenparenchyms der C3H- und JF1-Mäuse**

A) Die Volumina von Luftraum, Septum und Kapillarlumen B) Die Volumina von Luftraum, Septum und Kapillarlumen bezogen auf das Körpergewicht

**Tabelle 5 Die Signifikanzen der Volumina der Komponenten des Lungenparenchyms der C3H- und JF1-Mäuse**

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b>Luftraumvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	P<0,001	P=0,036	ns	ns	P<0,001	P<0,001
<b>Septenvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Kapillarlumen-volumen [mm<sup>3</sup>]</b>	P<0,001	ns	ns	ns	P=0,025	P=0,006
<b>Massenspezif. Luftraumvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,023	P=0,012	P=0,004	ns	P=0,006	ns
<b>Massenspezif. Septenvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P<0,001	P=0,016	P=0,005	ns	P<0,001	P=0,007
<b>Massenspezif. Kapillarlumen-volumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,042	ns	ns	ns	P=0,017	ns

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant

#### 4.2.3 Der Luftraum

Das Luftraumvolumen stellte sich als das größte Kompartiment dar. Bei Differenzierung in Alveolen und Ductuli (siehe Kapitel 3.4.1.3) zeigte sich, dass die Alveolen den größeren Teil des Luftraumvolumens ausmachten (C3H  $574 \pm 73 \text{ mm}^3$  (männlich),  $514 \pm 41 \text{ mm}^3$  (weiblich), JF1  $377 \pm 53 \text{ mm}^3$  (männlich),  $340 \pm 21 \text{ mm}^3$  (weiblich)). Die ductalen Volumina ergaben für die männlichen C3H-Mäuse:  $261 \pm 32 \text{ mm}^3$ , für die weiblichen  $237 \pm 28 \text{ mm}^3$ , für die männlichen JF1-Mäuse:  $167 \pm 26 \text{ mm}^3$  und für die weiblichen  $155 \pm 15 \text{ mm}^3$  (siehe Abb. 15A). Sowohl für das Alveolarraumvolumen als auch für das Ductalraumvolumen waren die Unterschiede zwischen den Stämmen signifikant zwischen beiden Geschlechtern. Ein signifikanter Geschlechtsunterschied ergab sich nicht.

Die körpergewichtsnormierten Werte können Tabelle 6 entnommen werden und sind in Abb. 15B graphisch dargestellt. Die Stamm-Unterschiede beim massenspezifischen Alveolarraumvolumen waren signifikant zwischen den männlichen Mäusen der beiden Stämme, ein signifikanter Geschlechtsunterschied trat nur bei C3H auf. Für das massenspezifische Ductalraumvolumen ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied nur zwischen den männlichen Mäusen der

beiden Stämme, ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern war nur innerhalb des C3H-Stammes erkennbar. Die Signifikanzen sind noch einmal in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 6 Das Luftraumvolumen, körpergewichtsnormierte Angaben für die Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

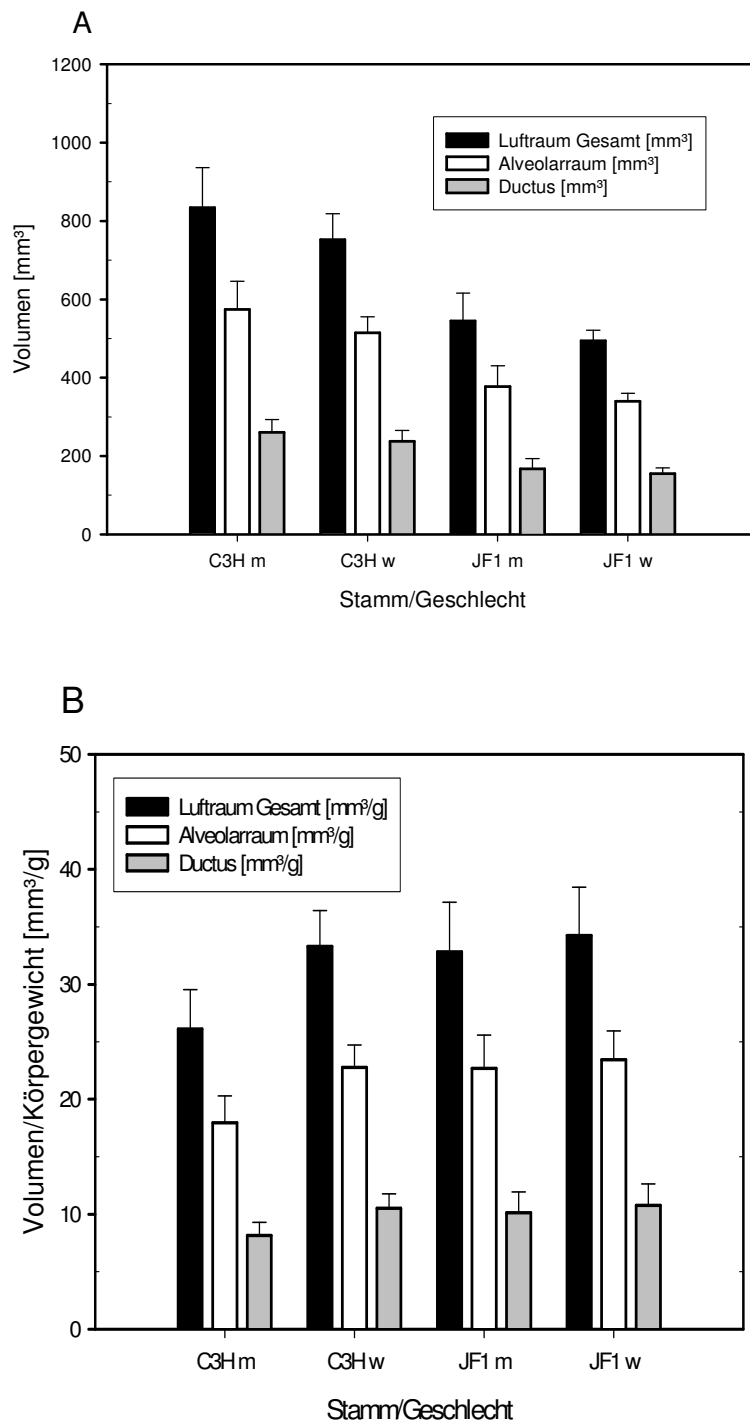
	C3H m	C3H w	JF1 m	JF1 w
<b>Massenspezif. Ductalraumvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	8,16 ± 1,15	10,52 ± 1,26	10,13 ± 1,81	10,76 ± 1,88
<b>Massenspezif. Alveolarraumvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	17,94 ± 2,36	22,77 ± 1,95	22,70 ± 2,89	23,43 ± 2,53

Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung

**Tabelle 7 Die Signifikanzen der Luftraumvolumina der C3H- und JF1-Mäuse**

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b>Alveolarraumvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	P<0,001	P=0,030	ns	ns	P<0,001	P<0,001
<b>Ductalraumvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>	P<0,001	ns	ns	ns	P<0,001	P<0,001
<b>Massenspezif. Alveolarraumvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,014	P=0,012	P=0,003	ns	P=0,003	ns
<b>Massenspezif. Ductalraumvolumen [mm<sup>3</sup>/g]</b>	ns	P=0,029	P=0,017	ns	P=0,041	ns

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant



**Abbildung 15 Das Luftraumvolumen der C3H- und JF1-Mäuse**

A) Die Luftraumvolumina B) Die Luftraumvolumina bezogen auf das Körpergewicht

Zur weiteren Charakterisierung des Alveolarraumes wurde die *Mean Chord Length* (Lcm) bestimmt (siehe Kapitel 3.4.1.4). Sie ist ein Indikator für die Alveolarweite. Lichtmikroskopisch war erkennbar, dass bei JF1-Mäusen die Alveolarweite deutlich kleiner war als bei den C3H-Mäusen. Dieses Resultat konnte auch in der Lcm bestätigt werden.

Die Werte für den C3H-Stamm lagen bei den männlichen Tieren bei  $74,3 \pm 9,9 \mu\text{m}$  und bei den weiblichen bei  $69,2 \pm 14,8 \mu\text{m}$ . Bei dem JF1-Stamm lagen sie bei den männlichen Tieren bei  $48,5 \pm 5,5 \mu\text{m}$  und bei  $47,3 \pm 2,0 \mu\text{m}$  bei den weiblichen. Sie sind graphisch in Abb. 16A dargestellt.

Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen, sowohl zwischen den männlichen als auch zwischen den weiblichen Tieren, nicht jedoch zwischen den Geschlechtern.

Die *Mean Face Length* (zur Bestimmung siehe Kapitel 3.4.1.4) dient ebenfalls zur weiteren Charakterisierung des Alveolarraumes, sie ist proportional zu der Anzahl an Alveolen (siehe Tabelle 8, Abb. 16B). Die Unterschiede waren nicht signifikant. Die Werte der *Mean Face Length* wurden auf das Körpergewicht normiert und sind in Tabelle 8 angegeben. Es zeigten sich signifikante stammspezifische Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Tieren, signifikante Geschlechtsunterschiede bestanden keine (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 8 *Mean Face Length* der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

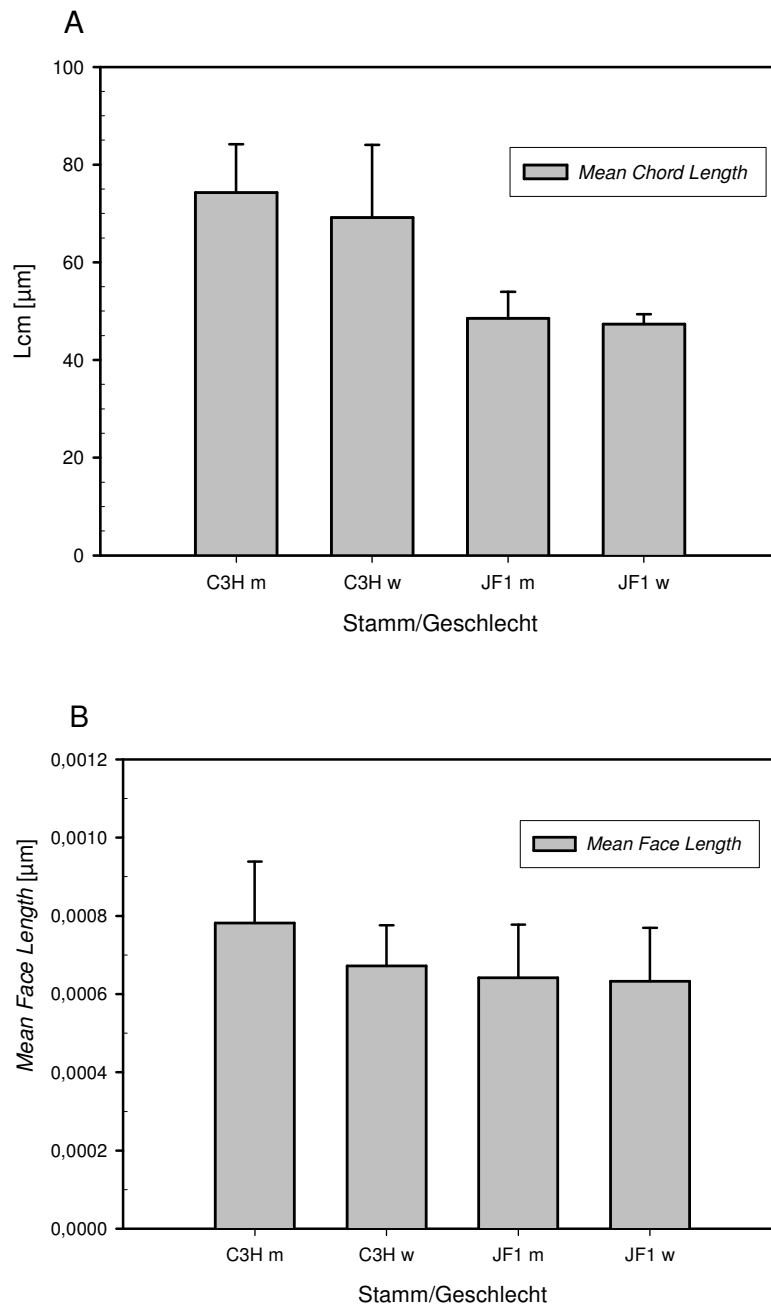
	C3H m	C3H w	JF1 m	JF1 w
<b><i>Mean Face Length</i></b> <b>[<math>\mu\text{m}</math>]</b>	0,00078 $\pm 0,00016$	0,00067 $\pm 0,00010$	0,00064 $\pm 0,00014$	0,00063 $\pm 0,00014$
<b>Massenspezif.</b> <b><i>Mean Face Length</i></b> <b>[<math>\mu\text{m/g}</math>]</b>	0,000024 $\pm 0,0000045$	0,000030 $\pm 0,0000045$	0,000040 $\pm 0,0000081$	0,000044 $\pm 0,0000097$

Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

**Tabelle 9 Signifikanzen von *Mean Face Length* und *Mean Chord Length* der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b><i>Mean Face Length</i></b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Massenspezif.</b> <b><i>Mean Face Length</i></b>	P<0,001	ns	ns	ns	P=0,003	P=0,003
<b>Lcm</b>	P=<0,001	ns	ns	ns	P=0,002	P=0,011

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant



**Abbildung 16 Charakterisierung des Luftraumes der C3H- und JF1-Mäuse**  
A) Mean Chord Length B) Mean Face Length

### 4.3 Oberflächendichte, Oberfläche und Dicke der Alveolarsepten

#### 4.3.1 Alveolaroberflächendichte und Alveolaroberfläche

Sowohl die Gesamtalveolaroberflächendichte als auch die Oberflächendichte der freien Septen wurden bestimmt (siehe Kapitel 3.4.1.4). Für die Gesamtalveolaroberflächendichte ergab sich für die männlichen C3H-Mäuse:  $0,103 \pm 0,007 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ , für die weiblichen  $0,105 \pm 0,013 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ , für die männlichen JF1-Mäuse:  $0,152 \pm 0,010 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  und für die weiblichen JF1-Mäuse  $0,159 \pm 0,011 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ . Graphisch dargestellt sind die Daten in Abb. 17.

Die Oberflächendichte der freien Septen betrug für den C3H-Stamm im Mittel:  $0,090 \pm 0,007 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (männlich) und  $0,091 \pm 0,011 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (weiblich). Für den JF1-Stamm lagen sie bei  $0,137 \pm 0,008 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (männlich) und  $0,145 \pm 0,012 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (weiblich).

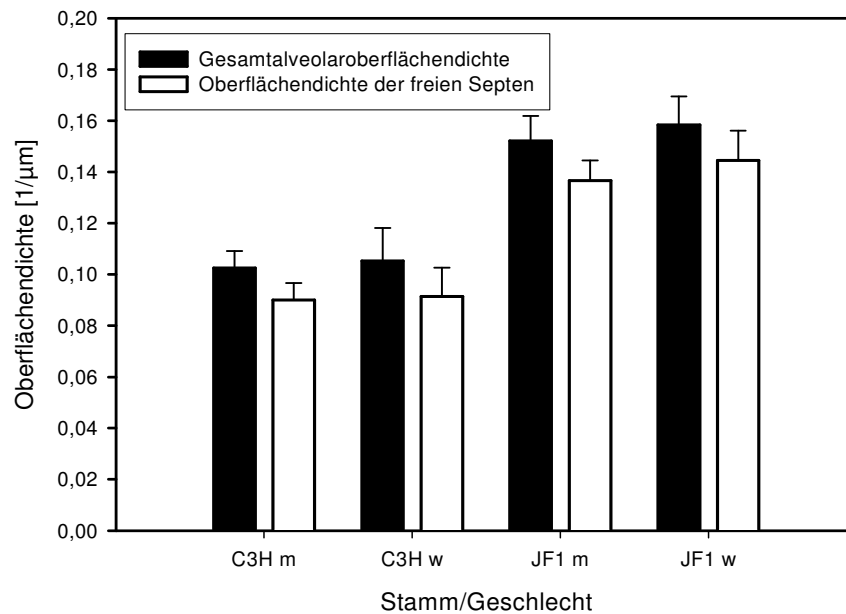
Es bestand hier sowohl für die Gesamtalveolaroberflächendichte als auch für die Oberflächendichte der freien Septen ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen (männliche und weibliche Tiere), nicht jedoch zwischen den Geschlechtern (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10** Signifikanzen der Alveolaroberflächendichte der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b>Oberflächendichte der freien Septen</b>	$P < 0,001$	ns	ns	ns	$P < 0,001$	$P < 0,001$
<b>Gesamtalveolar- oberflächendichte</b>	$P < 0,001$	ns	ns	ns	$P < 0,001$	$P < 0,001$

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant:  $P < 0,05$ ; ns = nicht signifikant





**Abbildung 17 Alveolaroberflächendichte der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

Aus der Oberflächendichte konnte dann auch die Oberfläche der Alveolarsepten bestimmt werden (siehe Kapitel 3.4.1.4), wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen und Geschlechtern festgestellt werden konnten, weder bei der Gesamtalveolaroberfläche noch bei der Oberfläche der freien Septen (siehe Abb. 18A).

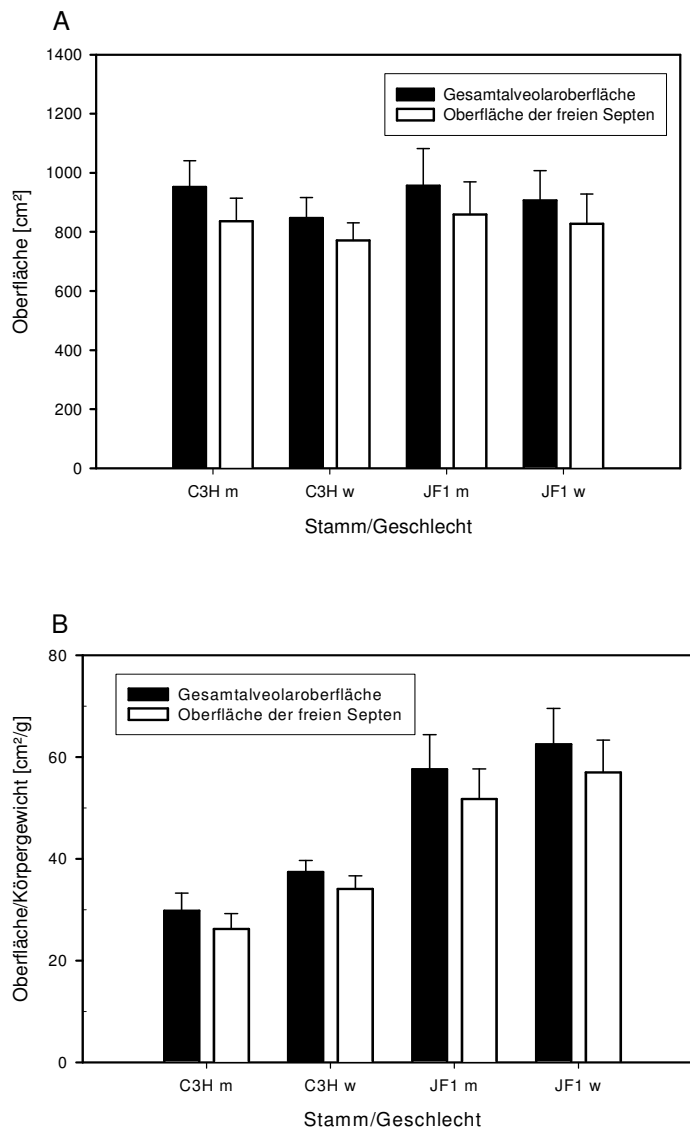
Für die Gesamtalveolaroberfläche der C3H-Mäuse ergab sich für die männlichen Tiere  $952 \pm 88 \text{ cm}^2$  und für die weiblichen Tiere  $847 \pm 70 \text{ cm}^2$ , für die JF1-Mäuse ergab sich für die männlichen Tiere  $957 \pm 125 \text{ cm}^2$  und  $906 \pm 102 \text{ cm}^2$  für die weiblichen Tiere.

Die Oberfläche der freien Alveolarsepten betrug für die männlichen C3H-Mäuse  $836 \pm 78 \text{ cm}^2$  und für die weiblichen  $771 \pm 60 \text{ cm}^2$ , für die männlichen JF1-Mäuse betrug sie  $859 \pm 111 \text{ cm}^2$  und für die weiblichen Tiere  $827 \pm 101 \text{ cm}^2$ .

Nach der Körpergewichtsnormierung betrug die Gesamtalveolaroberfläche der männlichen C3H-Mäuse  $29,8 \pm 3,4 \text{ cm}^2/\text{g}$ , der weiblichen  $37,4 \pm 2,2 \text{ cm}^2/\text{g}$ . Bei den männlichen JF1-Mäusen betrug sie  $57,6 \pm 6,8 \text{ cm}^2/\text{g}$  und bei den weiblichen  $62,5 \pm 7,1 \text{ cm}^2/\text{g}$ . Die Oberfläche der freien Alveolarsepten betrug bei den männlichen C3H-Mäusen  $26,2 \pm 3,0 \text{ cm}^2/\text{g}$ , bei den weiblichen  $34,1 \pm 2,6 \text{ cm}^2/\text{g}$ . Bei den männlichen JF1-Mäusen betrug sie  $51,7 \pm 6,0 \text{ cm}^2/\text{g}$  und bei den weiblichen  $57,0 \pm 6,4 \text{ cm}^2/\text{g}$ .

Es bestanden sowohl für die massenspezifische Oberfläche der freien Alveolarsepten als auch für die massenspezifische Gesamtalveolaroberfläche

signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen (männliche und weibliche Tiere) und Geschlechtern, wobei der Geschlechtsunterschied bei der Gesamtalveolaroberfläche/g nur bei den C3H-Mäusen zu finden war (siehe Tabelle 11). Graphisch werden die Daten in Abb. 18B dargestellt.



**Abbildung 18 Die Alveolaroberfläche der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

A) Die Gesamtalveolaroberfläche und die Oberfläche der freien Septen B) Die Oberflächen bezogen auf das Körpergewicht

**Tabelle 11 Signifikanzen der Alveolaroberfläche der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b>Oberfläche der freien Septen</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Massenspezif. Oberfläche der freien Septen</b>	P<0,001	P=0,003	P=0,01	P=0,074	P<0,001	P<0,001
<b>Gesamtalveolaroberfläche</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Massenspezif. Gesamtalveolaroberfläche</b>	P<0,001	P=0,01	P=0,022	ns	P<0,001	P<0,001

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant

#### 4.3.2 Arithmetische mittlere Dicke der Alveolarsepten

Aus den Volumina der Alveolarsepten sowie aus der Gesamtoberflächendichte wurde die arithmetische mittlere Dicke der Alveolarsepten berechnet (siehe Kapitel 3.4.1.4). Die männlichen C3H-Mäuse hatten eine Alveolarseptendicke von  $0,72 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , die weiblichen von  $0,82 \pm 0,14 \mu\text{m}$ . Bei den JF1-Mäusen ergaben sich für die männlichen Mäuse Werte von  $0,66 \pm 0,08 \mu\text{m}$ , für die weiblichen ergaben sich Werte von  $0,63 \pm 0,11 \mu\text{m}$ .

Die Unterschiede zwischen den Stämmen waren signifikant, zwischen den Geschlechtern nicht (siehe Tabelle 12).

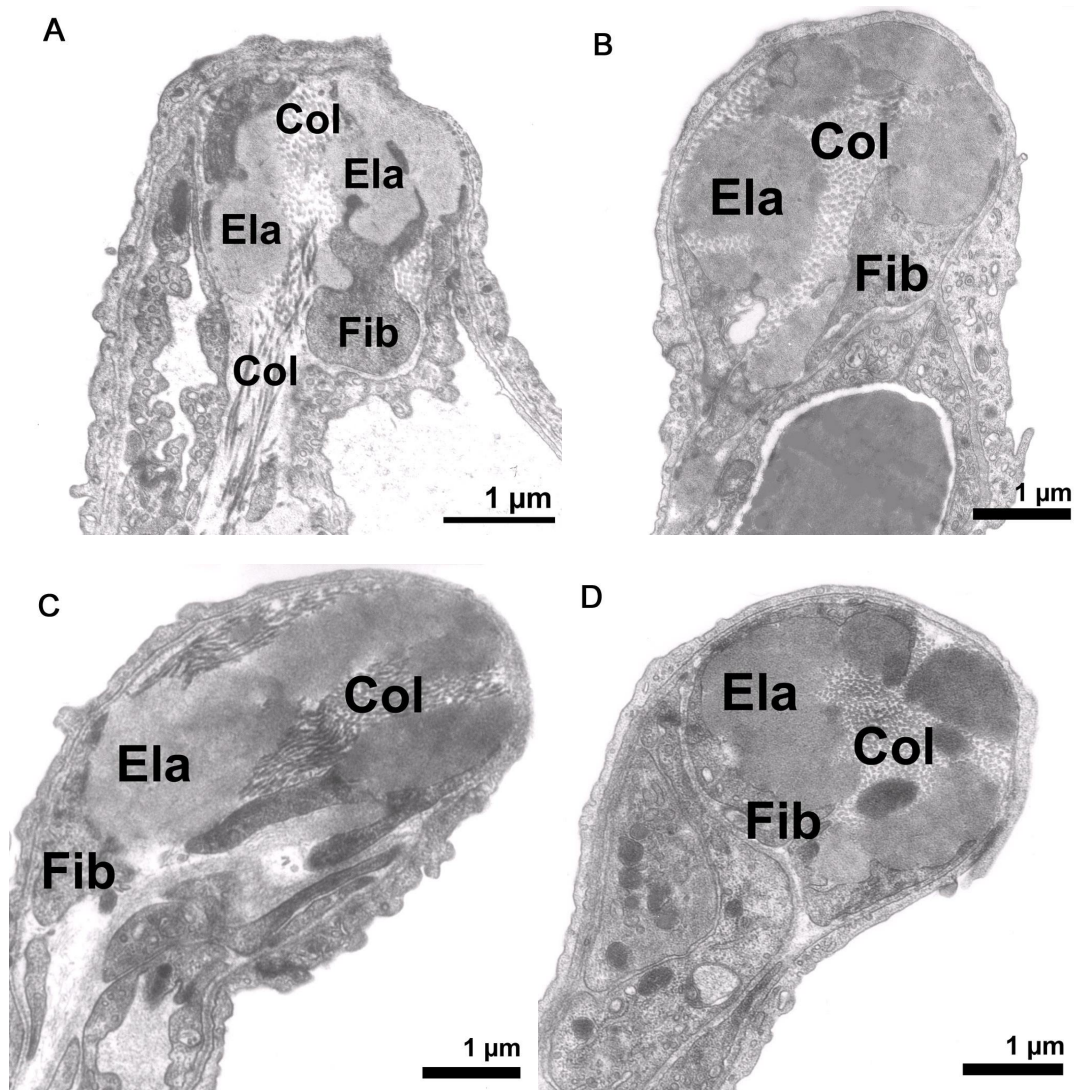
**Tabelle 12 Signifikanzen der arithmetischen mittleren Dicke der Alveolarsepten**

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b>Mittlere Dicke der Alveolarsepten</b>	P=0,009	ns	ns	ns	ns	P=0,005

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant

## 4.4 Elektronenmikroskopie

Die ultrastrukturellen Parameter der Lungen wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop analysiert (siehe Abb. 19).



**Abbildung 19 Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht über Endknöpfchen in Lungen der Stämme C3H und JF1**

Die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder zeigen eine Übersicht über Endknöpfchen aus den Lungen von Mäusen der beiden Stämme: A) Männliche C3H-Maus B) Männliche JF1-Maus C) Weibliche C3H-Maus D) Weibliche JF1-Maus.

Die Endknöpfchen bilden den ringförmigen Eingang aus den Ductuli in die Alveolen. Zur Stabilisierung werden sie durch einen hohen Gehalt an Elastin (Ela) und Kollagen (Col) verstärkt. Zudem sind Zellkerne von Fibrozyten (Fib) zu erkennen, die reife Form der Fibroblasten, die Elastin und Kollagen produzieren.

#### 4.4.1 Das Alveolarseptum

Das Alveolarseptum wurde auf elektronenmikroskopischer Ebene bezüglich seiner Zusammensetzung aus unterschiedlichen Geweben bzw. Zelltypen quantitativ analysiert (siehe Abb. 20). Hierbei wurden für die einzelnen Bestandteile zunächst deren Volumendichten (Volumenanteil am Gesamtseptenvolumen) ermittelt (siehe Tabelle 13, Kapitel 3.4.2). Die Unterschiede zwischen den Stämmen und Geschlechtern waren nicht signifikant.

Die absoluten Volumina der einzelnen Septumkompartimenten wurden wie beschrieben (siehe Kapitel 3.4.3) berechnet und können der Tabelle 14 entnommen werden. Sie sind graphisch in der Abb. 21A und in Abb. 21B als massenspezifische Parameter dargestellt.

**Tabelle 13 Volumendichte [%] der Bestandteile der Alveolarsepten der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

	<b>C3H m</b>	<b>C3H w</b>	<b>JF1 m</b>	<b>JF1 w</b>
<b>Volumendichte der Alveolarepithelzellen Typ I [%]</b>	28,2 ± 1,5	30,2 ± 2,1	30,5 ± 4,2	27,23 ± 2,4
<b>Volumendichte der Alveolarepithelzellen Typ II [%]</b>	9,0 ± 4,2	6,3 ± 3,4	12,5 ± 6,7	10,9 ± 4,0
<b>Volumendichte des Kapillarendothels [%]</b>	23,3 ± 2,3	22,8 ± 1,9	21,7 ± 3,1	21,2 ± 2,5
<b>Volumendichte des Interstitiums [%]</b>	32,9 ± 3,7	32,5 ± 3,0	28,2 ± 2,6	33,2 ± 3,1
<b>Volumendichte des Kollagens [%]</b>	2,78 ± 0,49	3,02 ± 0,62	2,63 ± 0,51	2,42 ± 0,41
<b>Volumendichte des Elastins [%]</b>	3,87 ± 1,23	5,3 ± 1,55	5,08 ± 1,06	5,08 ± 0,72

Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung

**Tabelle 14 Gesamtvolumen [mm<sup>3</sup>] der Bestandteile der Alveolarsepten pro Lunge**

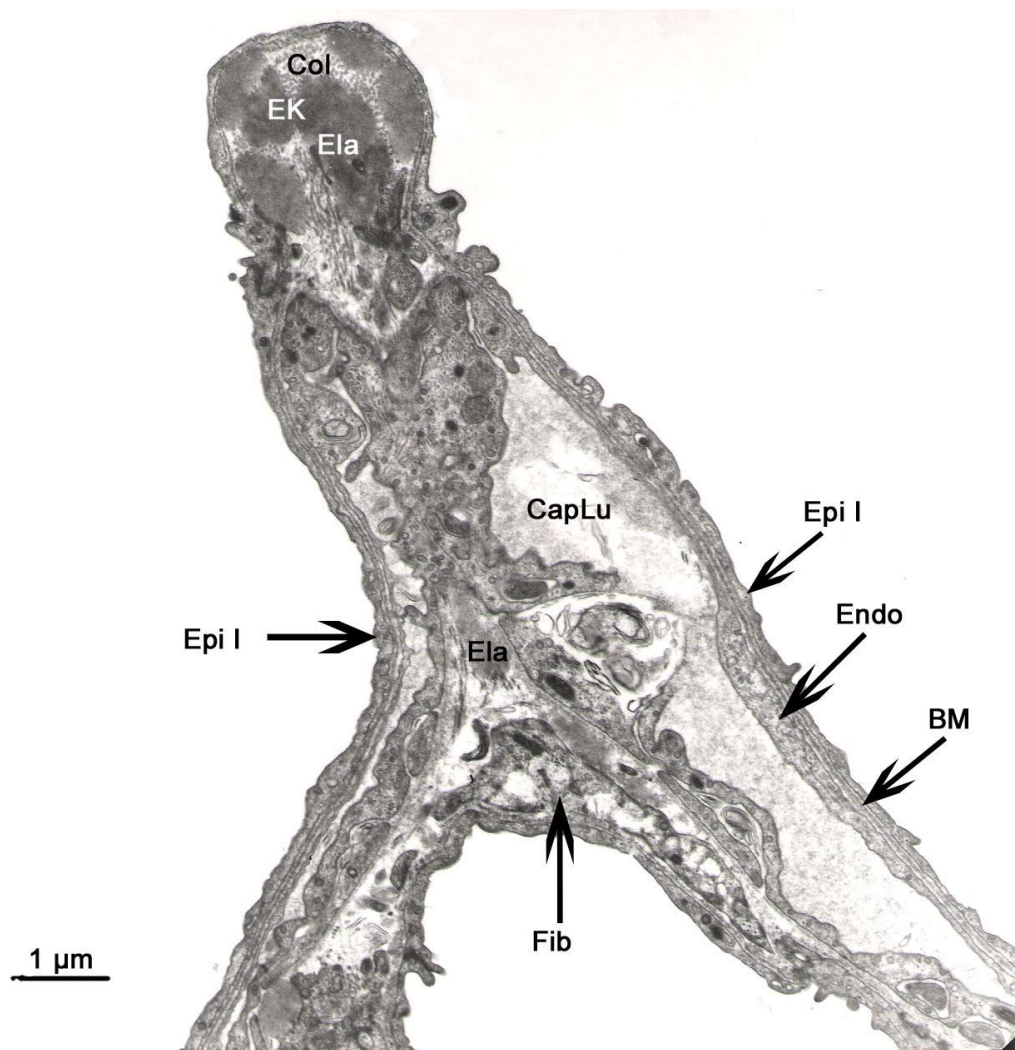
	<b>C3H m</b>	<b>C3H w</b>	<b>JF1 m</b>	<b>JF1 w</b>
<b>Volumen der Alveolarepithelzellen Typ I [mm<sup>3</sup>]</b>	19,5 ± 3,3	20,8 ± 4,0	19,2 ± 3,2	15,5 ± 3,5
<b>Volumen der Alveolarepithelzellen Typ II [mm<sup>3</sup>]</b>	6,0 ± 2,8	4,3 ± 1,5	7,8 ± 4,6	6,5 ± 2,7
<b>Volumen des Kapillarendothels [mm<sup>3</sup>]</b>	16,3 ± 3,7	15,8 ± 1,9	13,7 ± 1,4	11,8 ± 2,5
<b>Volumen des Interstitiums [mm<sup>3</sup>]</b>	22,7 ± 5,3	22,5 ± 4,5	17,5 ± 2,1	19,3 ± 6,1
<b>Volumen des Kollagens [mm<sup>3</sup>]</b>	1,91 ± 0,63	2 ± 0,63	1,65 ± 0,55	1,43 ± 0,52
<b>Volumen des Elastins [mm<sup>3</sup>]</b>	2,75 ± 1,33	3,67 ± 1,37	3,17 ± 0,41	2,96 ± 0,98

Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung

**Tabelle 15 Signifikanzen der Volumina der Septumbestandteile pro Lunge**

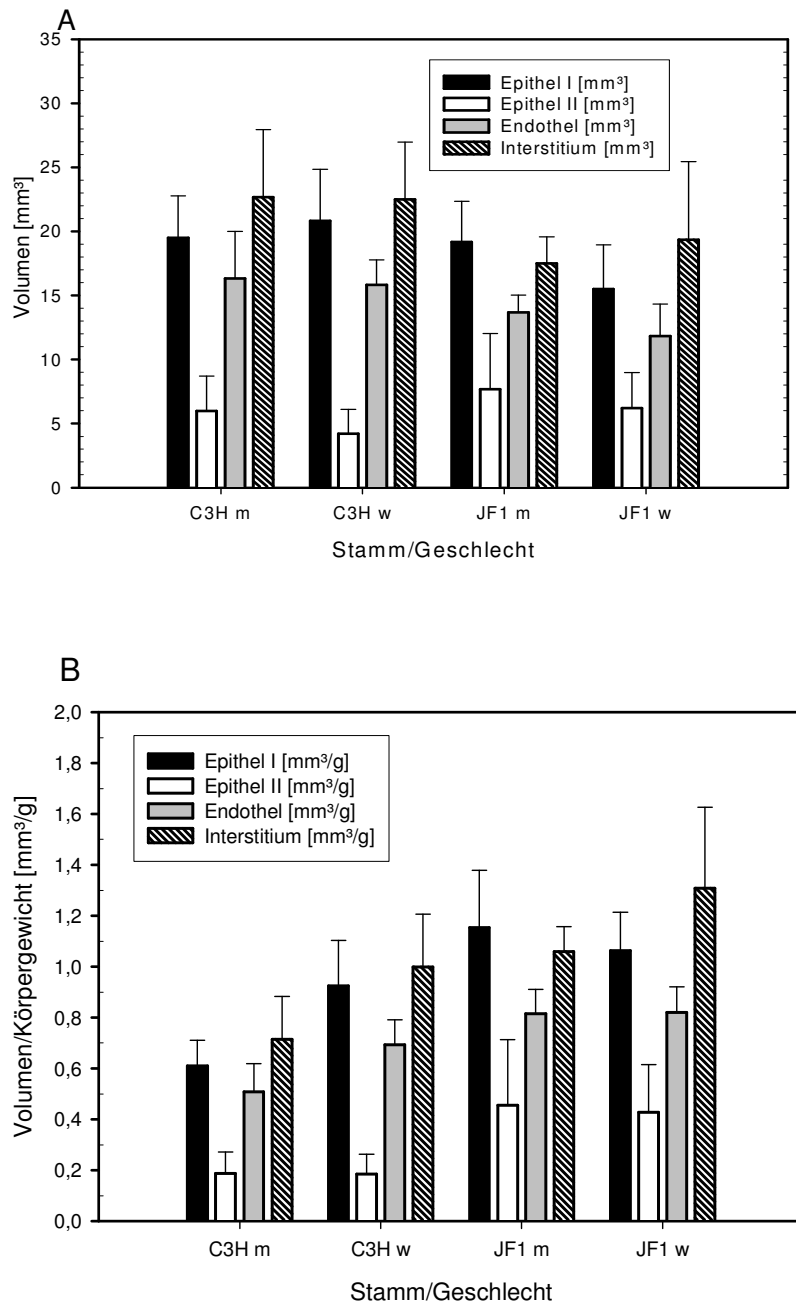
	<b>C3H vs. JF1</b>	<b>m vs. w</b>	<b>m vs. w in C3H</b>	<b>m vs. w in JF1</b>	<b>Stamm in m</b>	<b>Stamm in w</b>
<b>Volumen der Alveolarepithelzellen Typ I [mm<sup>3</sup>]</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Volumen der Alveolarepithelzellen Typ II [mm<sup>3</sup>]</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Volumen des Kapillarendothels [mm<sup>3</sup>]</b>	P=0,004	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Volumen des Interstitiums [mm<sup>3</sup>]</b>	P=0,043	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Volumen des Kollagens [mm<sup>3</sup>]</b>	P=0,034	ns	ns	ns	ns	P=0,032
<b>Volumen des Elastins [mm<sup>3</sup>]</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant



**Abbildung 20 Transmissionselektronenmikroskopisches Bild eines Alveolarseptums**

Das transmissionselektronenmikroskopische Bild zeigt einen Ausschnitt eines Septums einer weiblichen Maus des C3H-Stammes. Zum Luftraum hin wird das Septum begrenzt durch das Alveolarepithel aus Alveolarepithelzelle Typ I (Epi I). Durch eine Basalmembran (BM) getrennt grenzt daran das Kapillarendothel (Endo). Es kleidet die Kapillarlumina (CapLu) aus. Die Räume zwischen den einzelnen Kapillaren sind durch Interstitium mit Fibrozyten (Fib) ausgefüllt, durch das sich auch ein Netz aus elastischen Fasern (Ela) zieht. Man erkennt ein Endknöpfchen (EK) mit hohen Anteilen von Elastin (Ela) und Kollagen (Col).



**Abbildung 21 Das Septenvolumen (ohne elastische und kollagen Fasern) der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

A) Die Volumina der Septumanteile ohne elastische und kollagene Fasern B) Die Volumina der Septumanteile ohne elastische und kollagene Fasern bezogen auf das Körpergewicht



#### 4.4.1.1 Alveolarepithelzellen Typ I

Die Alveolarepithelzellen Typ I, die den größten Anteil der luftraumbegrenzenden Septumoberfläche bilden, machten nach dem Interstitium das größte Volumen des Alveolarseptums aus. Für den C3H-Stamm ergab sich:  $19,5 \pm 3,3 \text{ mm}^3$  (männlich) und  $20,8 \pm 4,0 \text{ mm}^3$  (weiblich). Für JF1:  $19,2 \pm 3,2 \text{ mm}^3$  (männlich) und  $15,5 \pm 3,5 \text{ mm}^3$  (weiblich) (siehe Tabelle 14, Abb. 21A).

Die Daten wiesen keine signifikanten Unterschiede auf, dies änderte sich jedoch beim Bezug auf das Körpergewicht (siehe Tabelle 16). Die Mäuse des JF1-Stammes zeigten ein deutlich größeres massenspezifisches Volumen der Alveolarepithelzellen Typ I als die Mäuse des C3H-Stammes. Die Unterschiede zwischen den Stämmen, bezogen auf die männlichen Mäuse, waren signifikant. Zudem bestand ein signifikanter Geschlechtsunterschied bei den C3H-Mäusen.

**Tabelle 16 Gesamtvolumen [ $\text{mm}^3/\text{g}$ ] der Bestandteile der Alveolarsepten pro Lunge bezogen auf das Körpergewicht**

	C3H m	C3H w	JF1 m	JF1 w
<b>Massenspezif. Volumen der Alveolarepithelzellen Typ I [<math>\text{mm}^3/\text{g}</math>]</b>	$0,61 \pm 0,10$	$0,93 \pm 0,18$	$1,15 \pm 0,22$	$1,06 \pm 0,15$
<b>Massenspezif. Volumen der Alveolarepithelzellen Typ II [<math>\text{mm}^3/\text{g}</math>]</b>	$0,19 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,26$	$0,43 \pm 0,19$
<b>Massenspezif. Volumen des Kapillarendothels [<math>\text{mm}^3/\text{g}</math>]</b>	$0,51 \pm 0,11$	$0,7 \pm 0,10$	$0,82 \pm 0,10$	$0,82 \pm 0,10$
<b>Massenspezif. Volumen des Interstitiums [<math>\text{mm}^3/\text{g}</math>]</b>	$0,72 \pm 0,17$	$1,0 \pm 0,21$	$1,06 \pm 0,10$	$1,31 \pm 0,32$
<b>Massenspezif. Volumen des Kollagens [<math>\text{mm}^3/\text{g}</math>]</b>	$0,06 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,03$
<b>Massenspezif. Volumen des Elastins [<math>\text{mm}^3/\text{g}</math>]</b>	$0,085 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,04$	$0,2 \pm 0,06$

Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

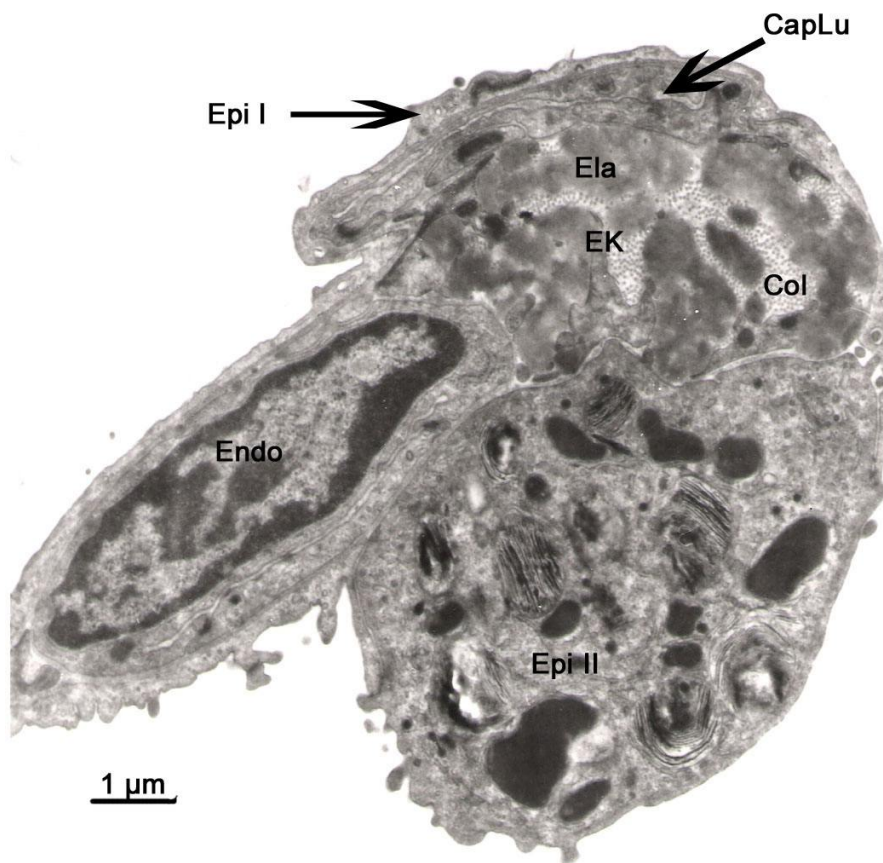
**Tabelle 17 Signifikanzen der Volumina der Septumbestandteile pro Lunge bezogen auf das Körpergewicht**

	<b>C3H vs. JF1</b>	<b>m vs. w</b>	<b>m vs. w in C3H</b>	<b>m vs. w in JF1</b>	<b>Stamm in m</b>	<b>Stamm in w</b>
<b>Massenspezif. Volumen der Alveolarepithelzellen Typ I [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P<0,001	ns	P=0,005	ns	P<0,001	ns
<b>Massenspezif. Volumen der Alveolarepithelzellen Typ II [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,001	ns	ns	ns	P=0,013	0,022
<b>Massenspezif. Volumen des Kapillarendothels [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P<0,001	P=0,033	P=0,005	ns	P<0,001	P=0,044
<b>Massenspezif. Volumen des Interstitiums [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,001	P=0,006	P=0,033	ns	P=0,011	P=0,021
<b>Massenspezif. Volumen des Kollagens [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,043	ns	P=0,037	ns	P=0,011	ns
<b>Massenspezif. Volumen des Elastins [mm<sup>3</sup>/g]</b>	P=0,002	P=0,031	P=0,011	ns	P=0,002	ns

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant

#### 4.4.1.2 Alveolarepithelzellen Typ II

Die sezernierenden Alveolarepithelzellen Typ II (siehe Abb. 22) machten das geringste Volumen des Septums aus. C3H:  $6,0 \pm 2,8 \text{ mm}^3$  (männlich) und  $4,3 \pm 1,5 \text{ mm}^3$  (weiblich). JF1:  $7,8 \pm 4,6 \text{ mm}^3$  (männlich) und  $6,5 \pm 2,7 \text{ mm}^3$  (weiblich). Die Unterschiede waren nicht signifikant. Bei der Körpergewichtsnormierung der Volumina (siehe Tabelle 16) allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen, der sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Mäusen zu verzeichnen war. Ein signifikanter Geschlechtsunterschied bestand nicht.



**Abbildung 22      Transmissionselektronenmikroskopisches      Bild      einer Alveolarepithelzelle Typ II**

Das transmissionselektronenmikroskopische Bild zeigt einen Teil eines Alveolarseptums mit einer Alveolarepithelzelle Typ II (Epi II) einer männlichen JF1-Maus. Angrenzend liegt ein Endknöpfchen mit größeren Mengen an Elastin (Ela) und Kollagen (Col). Der übrige Teil des Septums ist von Alveolarepithel Typ I (Epi I) begrenzt. Im Septum verläuft eine Kapillare, bei der das Lumen erkennbar ist (CapLu) sowie ein Zellkern einer Kapillarendothelzelle (Endo).

#### 4.4.1.3 Das Kapillarendothel

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Endothelvolumen der Stämme und zwischen dem Endothelvolumen der Geschlechter. Für die C3H-Mäuse ergab sich bei den männlichen Tieren  $16,3 \pm 3,7 \text{ mm}^3$ , bei den weiblichen  $15,8 \pm 1,9 \text{ mm}^3$ . Beim JF1-Stamm betrug das Endothelvolumen bei den männlichen Tieren  $13,7 \pm 1,4 \text{ mm}^3$ , bei den weiblichen  $11,8 \pm 2,5 \text{ mm}^3$ . Bezog man die Volumina auf das Körpergewicht (siehe Tabelle 16), so zeigten sich ein signifikanter Stamm-Unterschied bei beiden Geschlechtern sowie ein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Mäusen des C3H-Stammes.

#### 4.4.1.4 Das Interstitium ohne elastische und kollagene Fasern

Das Interstitium machte den größten Teil des Septumvolumens aus. Kollagene und elastische Fasern wurden getrennt bestimmt (siehe Kapitel 3.4.2.5). Die Volumina des Interstitiums für den C3H-Stamm waren bei den männlichen Tieren  $22,7 \pm 5,3 \text{ mm}^3$  und bei den weiblichen  $22,5 \pm 4,5 \text{ mm}^3$ , für den JF1-Stamm lagen sie bei den männlichen Mäusen bei  $17,5 \pm 2,1 \text{ mm}^3$  und bei den weiblichen bei  $19,3 \pm 6,1 \text{ mm}^3$ . Der Unterschied zwischen den Stämmen war ebenso wenig signifikant wie der zwischen den Geschlechtern.

Bei Bezug der Volumina auf das Körpergewicht bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen (zwischen männlichen und weiblichen Tieren) sowie zwischen den Geschlechtern des C3H-Stammes (siehe Tabelle 16).

#### 4.4.1.5 Elastische und kollagene Fasern

Kollagen und Elastin wurden bei der Betrachtung des Interstitiums getrennt ausgewertet, da der Zusammenhang der elastischen Fasern mit der Lungenfunktion überprüft werden sollte (siehe Abb. 24). Sie sind in Abb. 23A dargestellt sowie in Abb. 23B bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse.

Der Anteil an Kollagen war niedriger als der von Elastin. Für den C3H-Stamm lag er bei  $1,91 \pm 0,51 \text{ mm}^3$  (männlich) und  $2,00 \pm 0,52 \text{ mm}^3$  (weiblich) und für den JF1-Stamm bei  $1,65 \pm 0,37 \text{ mm}^3$  (männlich) und  $1,43 \pm 0,57 \text{ mm}^3$  (weiblich). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen Tieren der Stämme. Bezog man die Volumina auf das Körpergewicht, so präsentierte sich ein signifikanter stammspezifischer Unterschied zwischen den männlichen Mäusen sowie ein Geschlechtsunterschied bei den C3H-Mäusen.

Die Volumina für Elastin betrugen bei den männlichen C3H-Mäusen  $2,75 \pm 1,26 \text{ mm}^3$  und bei den weiblichen C3H-Mäusen  $3,67 \pm 1,42 \text{ mm}^3$ , bei den männlichen JF1-Mäusen  $3,17 \pm 0,62 \text{ mm}^3$  und bei den weiblichen  $2,69 \pm 0,99 \text{ mm}^3$ .

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen und zwischen den Geschlechtern.

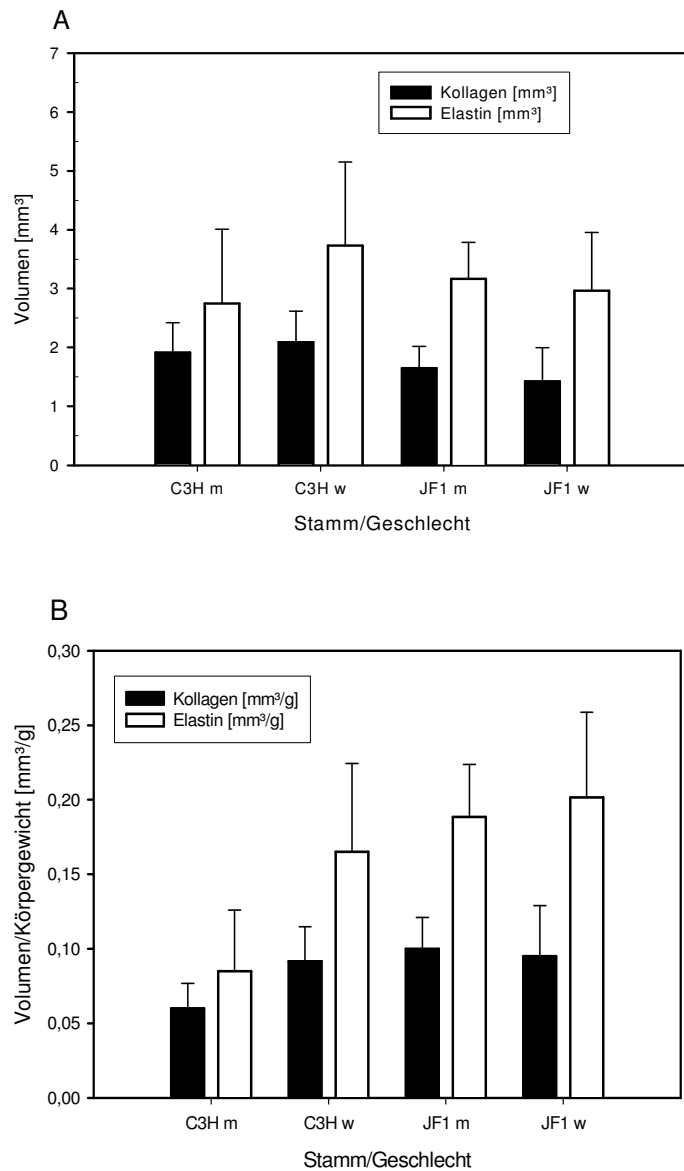
Bei dem Bezug auf das Körpergewicht wurde hier wiederum ein Unterschied deutlich, er war signifikant zwischen den männlichen Mäusen der Stämme und auch zwischen den Geschlechtern innerhalb des C3H-Stammes.

Das Verhältnis von Elastin zu Kollagen war bei den C3H-Mäusen deutlich kleiner als bei den JF1-Mäusen (C3H:  $1,40 \pm 0,30$  (männlich),  $1,83 \pm 0,31$  (weiblich), JF1:  $1,95 \pm 0,31$  (männlich),  $2,12 \pm 0,21$  (weiblich)). Die Unterschiede zwischen den Stämmen und Geschlechtern waren signifikant, der Geschlechtsunterschied allerdings nur bei den C3H-Mäusen (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18 Signifikanzen des Verhältnisses von Elastin/Kollagen der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

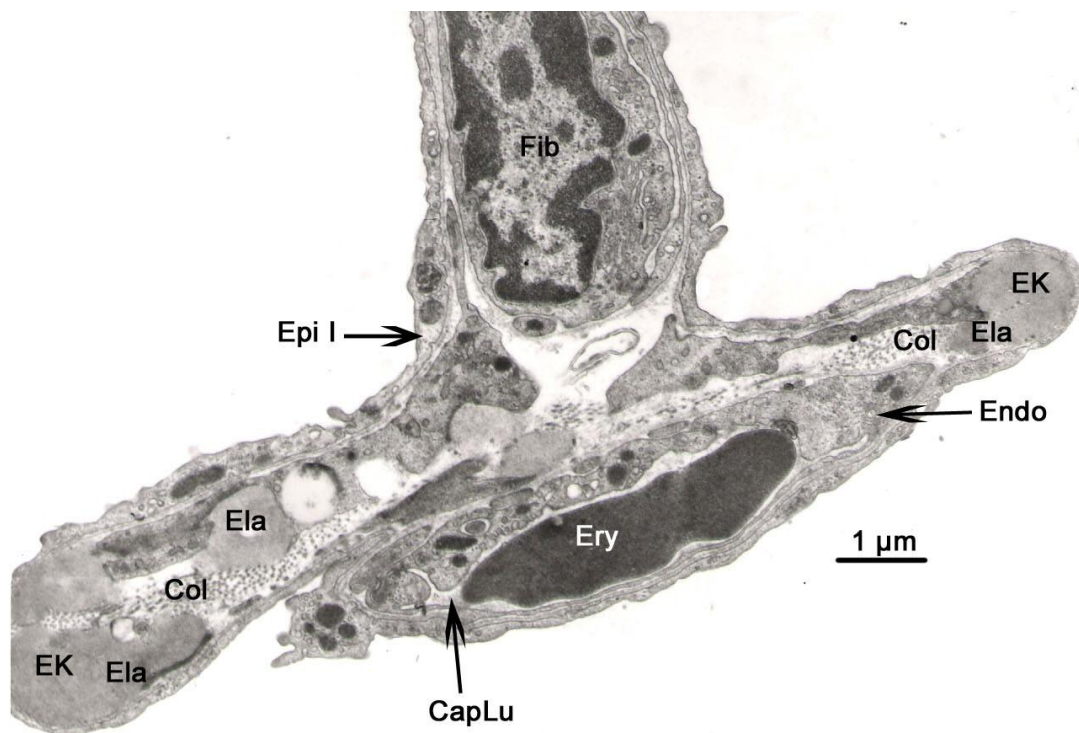
	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
<b>Verhältnis Elastin/Kollagen</b>	P=<0,001	P=0,036	P=0,047	ns	P=0,004	P=0,035

Angegeben sind die Signifikanzen des Vergleichs der Stämme JF1 und C3H (C3H vs. F1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Two-way-ANOVA und des Tukey-Testes geprüft. Signifikant: P<0,05; ns = nicht signifikant



**Abbildung 23 Die Volumina der elastischen und kollagenen Fasern der Lungen der C3H- und JF1-Mäuse**

A) Volumina der elastischen und kollagenen Fasern B) Volumina der elastischen und kollagenen Fasern bezogen auf das Körpergewicht



**Abbildung 24 Transmissionselektronenmikroskopisches Bild von Endknöpfchen der Lunge einer männlichen JF1-Maus**

In dem transmissionselektronenmikroskopischen Foto erkennt man zwei Endknöpfchen (EK). Sie bilden den ringförmigen Eingang aus den Ductuli in die Alveolen. Zur Stabilisierung werden sie durch einen hohen Gehalt an Elastin (Ela) und Kollagen (Col) verstärkt. Zudem ist auch ein Teil des Septums dargestellt, die Oberfläche zum Luftraum hin ist von Alveolarepithel Typ I (Epi I) bedeckt. Im Septum erkennt man eine Kapillare, in deren Lumen (CapLu) sich ein Erythrozyt (Ery) befindet. Ausgekleidet ist die Kapillare durch das Endothel (Endo). In einem anderen Teil des Septums erkennt man den Zellkern eines Fibrozyten (Fib). Das Bild stammt von einer männlichen JF1-Maus.

**Tabelle 19 Zusammenfassung der signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen und Geschlechtern**

	C3H vs. JF1	m vs. w	m vs. w in C3H	m vs. w in JF1	Stamm in m	Stamm in w
Körpergewicht	C3H > JF1	m > w	m > w	m > w	C3H > JF1	C3H > JF1
Lungenvolumen	C3H > JF1	m > w	m > w		C3H > JF1	C3H > JF1
Massenspezifisches Lungenvolumen	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	
Parenchymvolumen	C3H > JF1	m > w			C3H > JF1	C3H > JF1
Nicht-Parenchymvolumen	C3H > JF1				C3H > JF1	C3H > JF1
Kapillarlumenvolumen	C3H > JF1				C3H > JF1	C3H > JF1
Luftraumvolumen	C3H > JF1	m > w			C3H > JF1	C3H > JF1
Alveolarraumvolumen	C3H > JF1	m > w			C3H > JF1	C3H > JF1
Ductalvolumen	C3H > JF1				C3H > JF1	C3H > JF1
Massenspezifisches Parenchymvolumen	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	
Massenspezifisches Septumvolumen	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	C3H < JF1
Massenspezifisches Kapillarlumenvolumen	C3H < JF1				C3H < JF1	
Massenspezifisches Luftraumvolumen	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	
Massenspezifisches Alveolarraumvolumen	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	
Massenspezifisches Ductalraumvolumen		m < w	m < w		C3H < JF1	
Kollagenvolumen	C3H > JF1					C3H > JF1
Massenspezifisches Alveolarepithelzellvolumen Typ I	C3H < JF1		m < w		C3H < JF1	
Massenspezifisches Alveolarepithelzellvolumen Typ II	C3H < JF1				C3H < JF1	C3H < JF1
Massenspezifisches Kapillarendothelvolumen	C3H < JF1		m < w		C3H < JF1	C3H < JF1
Massenspezifisches Interstitiumvolumen	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	C3H < JF1
Massenspezifisches Kollagenvolumen	C3H < JF1		m < w		C3H < JF1	
Massenspezifisches Elastinvolumen	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	
Elastin/Kollagen-Verhältnis	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	C3H < JF1
Sv <sub>alv</sub>	C3H < JF1				C3H < JF1	C3H < JF1
Sv <sub>a</sub>	C3H < JF1				C3H < JF1	C3H < JF1
Massenspezifische S <sub>alv</sub>	C3H < JF1	m < w	m < w	m < w	C3H < JF1	C3H < JF1
Massenspezifische S <sub>a</sub>	C3H < JF1	m < w	m < w		C3H < JF1	C3H < JF1
Mean Face Length	C3H > JF1 (ns)	m > w (ns)	m > w (ns)	m > w (ns)	C3H > JF1 (ns)	C3H > JF1 (ns)
Massenspezifische Mean Face Length	C3H < JF1				C3H < JF1	C3H < JF1
Lcm	C3H > JF1				C3H > JF1	C3H > JF1
Mittlere Dicke der Alveolarsepten	C3H > JF1					C3H > JF1

Verglichen werden die Daten der Stämme (C3H vs. JF1) und der Geschlechter (m vs. w). Es wird weiter differenziert, ob der stammspezifische Unterschied zwischen den männlichen (Stamm in m) und/oder den weiblichen (Stamm in w) Mäusen besteht und ob der geschlechtsspezifische Unterschied innerhalb des C3H-Stammes (Geschlecht in C3H) und/oder innerhalb des JF1-Stammes (Geschlecht in JF1) besteht. Angegeben ist, ob die für den C3H-Stamm bzw. für die männlichen Mäuse (m) ermittelten Daten signifikant größer (>) oder kleiner (<) sind als die für den JF1-Stamm bzw. für die weiblichen Mäuse (w) ermittelten, ns = nicht signifikant.



## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob zwischen den Inzuchtstämmen C3H und JF1 und zwischen den Geschlechtern innerhalb der Stämme Unterschiede im ultrastrukturellen Aufbau der Lunge festzustellen sind. Bei diesen Stämmen waren in früheren Studien signifikante Differenzen bei Funktionsparametern der Lunge aufgefallen (Reinhard C 2002; Schulz H 2002; Reinhard C 2005), und es stellt sich die Frage, ob es hierfür strukturelle Korrelate gibt.

Die hinsichtlich ihres Phänotyps und ihres genetischen Hintergrunds sehr variierenden Stämme präsentierten auch Unterschiede im strukturellen Aufbau ihrer Lungen, sowohl zwischen den Stämmen als auch zwischen den Geschlechtern.

### 5.1 Das Körpergewicht

Bei einem Vergleich mit Daten aus der Literatur ist zu beachten, dass das Knochenwachstum von Mäusen ca. im 5. Lebensmonat endet, wobei das Körpergewicht über die ganze Lebensspanne hin weiter zunimmt (Glatt V 2007). Gut vergleichbar ist somit nur das Körpergewicht von Mäusen des gleichen Lebensalters.

Das Körpergewicht der C3H-Mäuse war größer als das der altersentsprechenden Tiere des JF1-Stammes. Zudem hatten die männlichen Mäuse beider Stämme jeweils ein höheres Körpergewicht als die weiblichen Tiere, wobei die weiblichen C3H-Mäuse ca. 70% des Gewichts der Männchen auf die Waage brachten, die weiblichen JF1-Mäuse hingegen ca. 87% des Gewichts der männlichen JF1-Mäuse hatten. Generell entsprechen diese Befunde Daten, die im Rahmen anderer Studien bereits berichtet wurden (siehe Tabelle 19). Im Detail lassen sich jedoch Unterschiede erkennen.

Im Vergleich zu den Werten, die Reinhard *et al.* (2002) an altersgleichen Tieren ermittelt und beschrieben hatten, waren die männlichen C3H-Mäuse der hier vorgelegten Untersuchung etwas schwerer. Die von Reinhardt *et al.* (2002) an weiblichen C3H-Mäusen erhobenen Werte entsprachen denen in unseren Studien gefundenen Körpergewichten. Die von Reed *et al.* (2007) berichteten Werte für das Körpergewicht von 16 Wochen alten C3H-Mäusen entsprachen denen dieser Dissertation.

Die in dieser Arbeit ermittelten Körpergewichte der männlichen sowie weiblichen JF1-Mäuse unterschieden sich von denen von Reinhard *et al.* (2005) an altersentsprechenden Tieren erhobenen. Die von Schulz *et al.* (2002) untersuchten etwa zehn Wochen alten JF1-Mäuse waren leichter als die 12-14 Wochen alten Tiere der Studie von Reinhard *et al.* (2005), allerdings waren sie schwerer als die 12-14 Wochen alten JF1-Mäuse dieser Arbeit. Die bei Reed *et al.* (2007) untersuchten JF1-Mäuse waren ebenfalls schwerer als die Tiere, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sie waren allerdings ca. 16 Wochen alt und damit zwei bis vier Wochen älter als die hier verwendeten Mäuse.

In allen Studien zeigte sich für beide Stämme ein größeres Körpergewicht der männlichen als der weiblichen Tiere.

In Tabelle 19 sind die Werte der unterschiedlichen Studien zusammengefasst.

**Tabelle 20 Vergleich des Körpergewichts und Lebensalters der Stämme in verschiedenen Studien**

	<b>Diese Arbeit</b>		<b>Reinhardt <i>et al.</i> (2002;2005)</b>		<b>Schulz <i>et al.</i> (2002)</b>		<b>Reed <i>et al.</i>(2007)</b>	
	<b>n = 6/Gruppe</b>		<b>n = 16/Gruppe</b>		<b>n = 10/Gruppe</b>		<b>n = 10/Gruppe</b>	
	Alter [Wochen]	KG [g]	Alter [Wochen]	KG [g]	Alter [Wochen]	KG [g]	Alter [Wochen]	KG [g]
<b>C3H m</b>	13	32,0 ± 1,4	12-14	29,0 ± 0,7			16	29
<b>C3H w</b>	13	22,6 ± 0,8	12-14	22,4 ± 0,6			16	22
<b>JF1 m</b>	12-14	16,6 ± 0,9	12-14	22,7 ± 0,7	10	21,5 ± 4,0	16	26
<b>JF1 w</b>	12-14	14,6 ± 1,6	12-14	16,5 ± 0,4	10	13,3 ± 0,3	16	17

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung; n = Tierzahl. Die Angaben aus Reed *et al.* (2007) wurden aus einer Graphik abgelesen. Die Angaben zu den Studien von Reinhardt *et al.* stammen aus den Jahren 2002 (C3H) und 2005 (JF1).

Die Unterschiede im Körpergewicht zwischen den Stämmen lassen sich durch genetische Effekte erklären (Bachmanov AA 2002; Reed DR 2007). Das im Vergleich zu den Weibchen größere Körpergewicht der Männchen beider Stämme ist ein bekanntes Phänomen des Sexualdimorphismus und bei vielen Säugetierarten zu beobachten (Reed DR 2007; Wells JCK 2007). Physiologische Variationen, das heißt natürlich auftretende Abweichungen zwischen den Individuen eines Stammes, können zu geringfügigen Unterschieden im Körpergewicht führen, wie sie zwischen den Tieren der einzelnen Studien aufgetreten sind (Li R 2008).

Das besonders geringe Körpergewicht der Männchen des JF1-Stammes, mit einem Unterschied von 5-6 g zu Männchen des gleichen Alters aus den anderen oben erwähnten Studien, lässt sich durch physiologische Variationen hingegen nicht zufriedenstellend erklären. Zwar variierte bei den JF1-Mäusen das Alter der Tiere zwischen 12 und 14 Wochen, während es bei den C3H-Mäusen konstant war (13 Wochen). Die Verteilung der Anzahl der Tiere verschiedenen Alters war allerdings in beiden Geschlechtern des JF1-Stammes gleich. Alle Tiere stammten aus zwei Würfen. Aus dem einen Wurf wurden jeweils vier Männchen und vier Weibchen und aus dem anderen Wurf jeweils zwei Männchen und zwei Weibchen entnommen.

Solche Verschiedenheiten wie sich hier beim Körpergewicht gezeigt haben können durch unterschiedliche Haltungsbedingungen entstehen. Käfiggröße und Anzahl der in einem Gehege gehaltenen Tiere, Wurfgröße und Futterversorgung können einen Einfluss auf das Wachstum und die Gewichtszunahme von Individuen haben. Stress kann dies ebenfalls beeinflussen. Derartige Unterschiede in den Haltungsbedingungen lagen bei den Mäusen unserer Studie jedoch vermutlich nicht vor (siehe Kapitel 3). Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse stammten aus denselben Zuchten wie die Mäuse der Studien von Reinhard *et al.* (2002; 2005) und Schulz *et al.* (2002).

Die beschriebenen Differenzen im Körpergewicht sind ausschlaggebend für die weitere Interpretation der als Absolutwerte erhobenen Daten. Da zu erwarten ist, dass die Körpergröße auch Einfluss auf die Größe der Lungen hat, wurden die Daten zusätzlich auf das Körpergewicht normiert, da dadurch auch Tiere mit unterschiedlichen Gewichten besser zu vergleichen sind. Darum wird im Folgenden der Fokus der Diskussion auf die massenspezifischen Parameter gelegt.

.

## 5.2 Die Architektur der Lunge

Beim Aufbau der Lungen sind Unterschiede beim Lungenvolumen und Parenchymvolumen zwischen den beiden Stämmen deutlich geworden. Bei der Architektur des Luftraums zeigte sich, dass die JF1-Mäuse günstigere Bedingungen für den Gasaustausch besaßen. Die massenspezifische Gesamtalveolaroberfläche und der Luftraum der weiblichen Tiere waren größer als die der männlichen.

### 5.2.1 Lungenvolumen

Spezifische Unterschiede bei den Lungenvolumina bestanden sowohl zwischen den männlichen als auch zwischen den weiblichen Tieren der untersuchten Stämme. Das Lungenvolumen der C3H-Mäuse war größer als das der JF1-Mäuse. Die Unterschiede kehrten sich allerdings um, wenn man das massenspezifische Lungenvolumen betrachtete. Dann waren die Lungenvolumina bezogen auf das Körpergewicht der männlichen JF1-Mäuse größer als die der männlichen C3H-Mäuse. Zwischen den weiblichen Mäusen der Stämme bestand dieser Unterschied nicht.

Reinhard *et al.* (2005) beschrieben ebenfalls stammspezifische Unterschiede im Lungenvolumen der Männchen und der Weibchen der beiden verwendeten Mausstämmen. Allerdings wurde in der Studie von Reinhard *et al.* (2005) die totale Lungenkapazität (*total lung capacity*, TLC) rechnerisch aus dem ermittelten inspiratorischen Reservevolumen (IRC), dem expiratorischen Reservevolumen (ERV) und der funktionellen Residualkapazität (FRC) bestimmt. Sie ist somit nur indirekt vergleichbar mit dem hier bestimmten Lungenvolumen durch Wasserverdrängung nach Scherle (1970).

Die stammspezifischen Unterschiede in der Studie von Reinhardt *et al.* (2005) bestanden sowohl bezüglich der totalen Lungenkapazität als auch bezüglich des Totraumvolumens. Allerdings präsentierte sich bei Reinhard *et al.* (2005) nach Normierung auf das Körpergewicht nicht die in dieser Arbeit gefundene Umkehr des Größenverhältnisses.

Tankersley *et al.* (1999a) ermittelten für die TLC von männlichen C3H-Mäusen den gleichen Wert wie Reinhard *et al.* (2005), obwohl die Mäuse mit ca. 8 Wochen Lebensalter jünger waren als die Mäuse aus der Arbeit von Reinhard *et al.* (2005). Auffällig war hier, dass das Lungenvolumen der C3H-Mäuse von den drei untersuchten Stämmen (C3H, B6, A/J) und der Kreuzung aus C3H und B6 (B6C3F<sub>1</sub>/J) das größte war, es beim Körpergewicht aber keine stammspezifischen Unterschiede gab. Somit zeigte sich, dass C3H-Mäuse im Vergleich zu mehreren anderen Mausstämmen ein sehr großes massenspezifisches Lungenvolumen besaßen. Die in dieser Arbeit ermittelten massenspezifischen Werte für das Lungenvolumen machten aber deutlich, dass JF1-Mäuse im Verhältnis zum Körpergewicht größere Lungen besaßen als die männlichen C3H-Mäuse.

In der Größe des Lungenvolumens bestand ein Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen C3H-Mäusen, die massenspezifischen Volumina der

Weibchen waren größer als die der Männchen. Bei den JF1-Mäusen fand sich dieser Unterschied nicht.

Reinhard *et al.* (2002) beschrieben, dass die Männchen des C3H-Stammes ein größeres Lungenvolumen besaßen als die Weibchen, nach der Körpergewichtsnormierung fand sich allerdings kein Unterschied mehr zwischen den Geschlechtern.

Für die Mäuse des JF1-Stammes beschrieben Schulz *et al.* (2002) ebenfalls, dass die männlichen Mäuse eine größere Vitalkapazität (entspricht ca. 90% der TLC) und ein größeres inspiratorisches Reservevolumen besaßen als die weiblichen Mäuse. Bei Normierung der VC, des IRC sowie des Totraumvolumens auf das Körpergewicht waren diese Parameter bei weiblichen Mäusen größer als bei männlichen.

Die möglichen Gründe für die beschriebenen Unterschiede im Lungenvolumen von C3H- und JF1- und von weiblichen und männlichen Mäusen werden in Kapitel 5.2.3 diskutiert.

## **5.2.2 Das Parenchym**

Bei den massenspezifischen Volumina des Lungenparenchyms gab es stammspezifische Unterschiede zwischen den Männchen der untersuchten Stämme. Geschlechtsunterschiede ergaben sich für die körpergewichtsnormierten Parenchymvolumina der C3H-Mäuse. Die Männchen hatten ein geringeres massenspezifisches Parenchymvolumen als die Weibchen. Die massenspezifischen Unterschiede im Parenchymvolumen entsprachen den massenspezifischen Unterschieden im Lungenvolumen.

In der Literatur liegen keine Vergleichsdaten bezüglich des Parenchymvolumens der Lungen der untersuchten Stämme vor.

## **5.2.3 Der Luftraum**

### **5.2.3.1 Stammspezifische Unterschiede**

Wichtige Faktoren, die die Fähigkeit des Gasaustausches bestimmen, sind die Größe des Gasaustauschbereiches und die Dicke der Blut-Luft-Schranke. Für die Größe des Gasaustauschbereiches ist die alveoläre Oberfläche, an der der Gasaustausch stattfinden kann, entscheidend (siehe Kapitel 1.4) (Powell FL 2004;

Osmanliev DP 2005). Die massenspezifische Gesamtalveolaroberfläche der JF1-Mäuse war größer und die Alveolarsepten waren dünner als die der C3H-Mäuse, damit hatten die Mäuse des JF1-Stammes folglich die günstigeren Bedingungen für den Gasaustausch als die C3H-Mäuse. Eine Begründung hierfür liegt am ehesten in einem erhöhten Sauerstoffbedarf der JF1-Mäuse und wird im Folgenden diskutiert. Die JF1-Mäuse hatten eine größere Gesamtalveolaroberflächendichte, eine größere massenspezifische Gesamtalveolaroberfläche und eine dünnere arithmetische mittlere Dicke der Alveolarsepten als die C3H-Mäuse und damit auch einen größeren Gasaustauschbereich und eine größere Diffusionskapazität. Die JF1-Mäuse besaßen zudem eine größere Anzahl an Alveolen, wie durch die berechnete *Mean Face Length* deutlich gemacht wurde, die proportional zur Anzahl der Alveolen ist (Hyde, DM, Davis, Kalifornien, persönliche Mitteilung). Die massenspezifische *Mean Face Length* war bei den JF1-Mäusen größer als bei den C3H-Mäusen.

Zur näheren Charakterisierung des Luftraumes wurde die *Mean Chord Length* (Lcm) bestimmt, die ein Indikator für die mittlere freie Wegstrecke der Gasaustauschräume, also für die Weite der Ductal- und Alveolarräume ist. Diese Wegstrecke war bei den Tieren des C3H-Stammes größer als bei den Tieren des JF1-Stammes. Trotzdem waren die massenspezifischen Volumina von Ductal- und Alveolarraum der männlichen JF1-Mäuse größer als die der männlichen C3H-Mäuse. Daraus war zu schließen, dass die Unterschiede in der massenspezifischen Gesamtalveolaroberfläche und in den Luftraumvolumina dadurch bedingt waren, dass die JF1-Mäuse zwar kleinere, aber mehr Alveolen besaßen. Dies konnte bereits in der lichtmikroskopischen Übersicht beobachtet werden (siehe Abb. 12).

Es gibt in der Literatur bisher nur eine Studie zur Architektur des Luftraumes, bei der die Stämme C3H und JF1 miteinander verglichen werden. Reinhard *et al.* (2005) verglichen die pulmonale Diffusionskapazität der Stämme für Kohlenmonoxid, die ein Hinweis auf Unterschiede der alveolären Oberfläche und der Blut-Luft-Schranke sein kann: denn je größer die Oberfläche und je dünner die Blut-Luft-Schranke, desto größer die Diffusionskapazität. Die Diffusionskapazität der C3H-Mäuse war größer als die der JF1-Mäuse. Nach Normierung auf das alveoläre Volumen zeigte sich eine größere Diffusionskapazität pro Volumen für die männlichen JF1-Mäuse im Vergleich zu den männlichen C3H-Mäusen. Zwischen den weiblichen Mäusen der beiden Stämme bestand kein Unterschied. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, dass die massenspezifische Oberfläche der Alveolen der JF1-Mäuse größer war als die der C3H-Mäuse und ihnen somit relativ

eine größere Fläche für den Gasaustausch zur Verfügung stand. Zudem war die arithmetische mittlere Dicke der Alveolarsepten der JF1-Mäuse dünner, damit haben sie auch eine dünnere Blut-Luft-Schranke und die Diffusionskapazität ist höher.

In zwei Studien beschreiben Soutiere *et al.* (2004a, b) die Unterschiede in der Alveolarweite zwischen männlichen Individuen von drei verschiedenen Mausstämmen, darunter auch C3H-Mäuse. In diesen Studien wurden unterschiedliche Methoden zur Fixierung verwendet. In der ersten Studie lag die Lcm bei ca. 45  $\mu\text{m}$  und war damit nur halb so groß wie bei den Mäusen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Bei Soutiere wurden die Lungen über die Trachea mit 7 oder 14 cm  $\text{H}_2\text{O}$  über vier Stunden fixiert. Dabei handelt es sich um das gleiche Verfahren, das in dieser Arbeit angewendet wurde. Allerdings war in unserer Studie der Druck bei der Fixation höher (20 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ), die Fixationszeit kürzer (20 Minuten), und die Mäuse waren älter (in der Studie von Soutiere *et al.* (2004b) 6-8 Wochen). Die verwendeten Einbettungsmedien waren in allen Arbeiten die gleichen (Technovit). Durch die Verfahrensunterschiede lässt sich wohl der deutliche Unterschied in der Lcm erklären, denn besonders ein höherer Fixationsdruck hat erheblichen Einfluss auf die gemessene Alveolarweite (Mercer RR 1987). In der zweiten Studie von Soutiere *et al.* (2004a) wurden die Lungen 6-8 Wochen alter Tiere durch Gefrieren bei  $-180^\circ\text{C}$  fixiert und anschließend bei konstanten  $-70^\circ\text{C}$  in Aceton gelagert. Die Einbettung erfolgte auch hier mit Technovit. Die bestimmte Lcm lag zwischen 63 und 69  $\mu\text{m}$  je nach Druck, bei dem die Lungen fixiert worden war (30-60 cm $\text{H}_2\text{O}$ ). Damit war sie geringer als die hier für die männlichen C3H-Mäuse bestimmte Lcm, aber höher als bei Soutiere *et al.* (2004b), was am ehesten mit dem höheren Fixationsdruck zusammenhängt.

Es wurden in der Literatur keine Angaben gefunden zur arithmetischen mittleren Dicke der Alveolarsepten der hier untersuchten Stämme. Bei Mercer *et al.* (1994) aber wurde die Dicke des interstitiellen Raumes der Alveolarsepten bei Mäusen (Stamm nicht näher bezeichnet) bestimmt. Es ergab sich eine Dicke von ca. 0,6  $\mu\text{m}$  (aus Graphik abgelesen). Laut Weibel (1984a) machen Alveolarepithel und Kapillarendothel jeweils etwa ein Viertel der Septumdicke aus, das heißt die mittlere Dicke des Alveolarseptums der bei Mercer *et al.* (1994) untersuchten Mäuse würde ca. 1,2  $\mu\text{m}$  betragen und wäre damit etwas dicker als bei den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen. Mercer *et al.* (1994) zeigten in der Studie beim Vergleich von mehreren Spezies ebenfalls, dass die Dicke des Alveolarseptum linear war zu Veränderungen des Radius der Alveolen. Tiere mit größeren Alveolen hatten folglich ein dickeres Alveolarseptum, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Das erklärt die deutlich geringere Dicke der Alveolarsepten der hier untersuchten

Mäuse im Vergleich zu menschlichen Lungen, bei denen die Dicke der Blut-Luft-Schranke ca. 2,2  $\mu\text{m}$  (Barry BE 1985) beträgt.

In einer Studie von Kida *et al.* (1989) wurden Lungenstrukturparameter zweier Mausstämmen (C57B/6CrSlc, DBA/2CrSlc) und ihrer Nachfahren ( $F_1$ -Kreuzungen der beiden Stämme) miteinander verglichen. Berechnet man aus den dort angegebenen Daten zu Septumvolumen und Alveolaroberfläche die mittlere Septendicke, so ergeben sich für die beiden dort verwendeten Stämme Werte um 0,9  $\mu\text{m}$  und damit ähnliche Werte wie bei den in dieser Arbeit verwendenden C3H-Mäusen. Ebenfalls ähnlich wie in der vorgelegten Arbeit waren dort die Tiere eines Inzuchtstammes (DBA/2CrSlc) schwerer und das Lungenvolumen und der Alveolarraum größer als bei dem anderen Inzuchtstamm (C57B/6CrSlc). Nach Normierung auf das Körpergewicht ergab sich auch hier für die Mäuse des Stammes mit den kleineren Tieren ein massenspezifisch größeres Lungenvolumen. Über Berechnungen der genetischen Einflüsse des Vater- und des Muttertiers auf die  $F_1$ -Kreuzungen wurde nachgewiesen, dass diese Unterschiede genetisch determiniert sind (Kida K 1989). Reinhard *et al.* (2005) haben die Genorte für die sich unterscheidenden Lungenfunktionsparameter bestimmt (Chromosom 5 für Totraumvolumen und spezifische *Compliance*; Chromosom 15 für Lungengröße, *Compliance*, Totraumvolumen und Diffusionskapazität; Chromosom 17 für Lungengröße und Diffusionskapazität; Chromosom 19 für *Compliance* und spezifische *Compliance*). Ganguly *et al.* (2007) haben an den von Reinhard *et al.* (2005) identifizierten Genorten entsprechende Unterschiede in der Genexpression (SOD3, TFF2 und ENPP2) zwischen den C3H- und JF1-Stämmen nachgewiesen. Eine genetische Determination lässt sich somit auch für die stammspezifischen Unterschiede der Lungenfunktionsparameter in dieser Arbeit vermuten.

Durch genetische Determination lässt sich erklären, warum es zu phänotypischen Unterschieden zwischen den Inzuchtstämmen kommt. Tenney und Remmers (1963) bieten dafür einen Erklärungsansatz auf funktioneller Ebene. Sie beschrieben, dass massenspezifische Bedürfnisse für Sauerstoff durch Unterschiede in der Alveolargröße reguliert werden. Folglich haben kleine Organismen mit hohem massenspezifischem Sauerstoffverbrauch kleinere Alveolen und eine größere auf das Körpergewicht bezogene alveoläre Oberfläche als größere Organismen, die einen kleineren massenspezifischen Sauerstoffverbrauch haben (Tenney SM 1963). Kleinere Alveolen haben eine größere Alveolaroberflächendichte (Carey MA 2007a), wie auch bei den Lungen der JF1-Mäuse in dieser Arbeit, und damit haben sie eine erhöhte Diffusionskapazität für Sauerstoff (Powell FL 2004; Osmanliev DP 2005). Kommt es über längere Zeit zu erhöhtem Sauerstoffbedarf, so führt dies zu einer



Erhöhung der massenspezifischen Alveolaroberfläche (Gehr P 1978b), bei längerem Aufenthalt in großer Höhe nimmt die Anzahl an Alveolen zu (Thurlbeck WM 1975). Auch die Dicke der Blut-Luft-Schranke ist entscheidend für die Diffusionskapazität der Lunge, je dünner sie ist, desto günstiger ist dies für einen effizienten Gasaustausch (Weibel ER 1984a).

Ein erhöhter Sauerstoffbedarf der JF1-Mäuse könnte nun eine Erklärung sein für die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede bei der Lungenarchitektur zwischen den großen Mäusen des C3H-Stammes und den kleinen Mäusen des JF1-Stammes. Es stellt sich allerdings die Frage, was die Ursache eines solch höheren Sauerstoffbedarfs der JF1-Mäuse sein könnte. Hierzu soll im Folgenden die Literatur zur Atemmechanik näher betrachtet werden.

C3H-Mäuse haben eine ausgesprochen gute Dehnbarkeit der Lunge im Vergleich mit den JF1-Mäusen. Reinhard *et al.* (2005) ermittelten, dass die spezifische *Compliance* der C3H-Mäuse fast doppelt so groß ist wie die der JF1-Mäuse. Die besonders große *Compliance* der Lungen der C3H-Mäuse beschrieben auch Tankersley *et al.* (1999a). Entsprechende Unterschiede in Widerstand und Dehnbarkeit schilderten auch Held und Uhlig (2000). Sie untersuchten sechs Mausstämme, darunter auch C3H/HeN, ein dem in dieser Arbeit untersuchten C3H-Stamm eng verwandter Stamm. Bei Held und Uhlig (2000) fiel auf, dass die C3H/HeN-Mäuse eine außergewöhnlich große *Compliance* hatten (fast doppelt so hoch wie der nächst kleinere Stamm) und einen sehr kleinen Widerstand (fast halb so groß wie der nächst größere Stamm) (Held HD 2000). Zwar liegen keine Daten zum Atemwegswiderstand der C3H-Mäuse vor, erhoben wurden in der Arbeit von Schulz *et al.* (2002) aber unter anderem Werte für C3HeB/FeJ-Mäuse, die ein ähnliches Körpergewicht und Lungenvolumen wie die Mäuse des C3H-Stammes haben und einen signifikant geringeren Atemwegswiderstand als die JF1-Mäuse. Das bedeutet also, dass die C3H-Mäuse sehr günstige Bedingungen für die Atemarbeit aufweisen, da sie eine gute Dehnbarkeit bei vermutlich niedrigem Atemwegswiderstand haben.

Für die JF1-Mäuse hingegen fanden sich im Vergleich mit zwei weiteren Mausstämmen eher ungünstige Bedingungen für die Atemarbeit (Schulz H 2002). Das heißt, sie hatten eine sehr niedrige spezifische *Compliance* und im Vergleich zu den anderen von Schulz *et al.* (2002) untersuchten Stämmen (B6 und C3HeB/FeJ) einen besonders hohen Atemwegswiderstand und eine fast nur halb so große spezifische *Compliance* wie die C3H-Mäuse (Reinhardt C 2005).

Der hohe Widerstand bei der Atmung und die geringe Dehnbarkeit der Lunge führen zu einer größeren Atemarbeit und damit vermutlich zu einem erhöhten

Sauerstoffbedarf der JF1-Mäuse schon bei der Ruheatmung. Hoher Atemwegswiderstand und geringe Lungencompliance könnten somit eine Erklärung sein für den im Vergleich zu den C3H-Mäusen größeren Gasaustauschbereich und die dünnere Blut-Luft-Schranke.

### 5.2.3.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Betrachtet man die Geschlechter, so hatten die weiblichen Mäuse des C3H-Stammes eine größere massenspezifische Gesamtalveolaroberfläche als die Männchen. Bei den Mäusen des JF1-Stammes hatten die Weibchen eine größere massenspezifische Oberfläche der freien Septen, für die massenspezifische Gesamtalveolaroberfläche aber besteht kein Unterschied.

Es gab keine Unterschiede bei der arithmetischen mittleren Dicke der Alveolarsepten, bei der Anzahl (*Mean Face Length*) der Alveolen, auch die mittlere freie Wegstrecke der Gasaustauschräume (Lcm) und damit die Größe des Luftraumes unterschied sich nicht. Die massenspezifischen Volumina von Ductal- und Alveolarraum allerdings waren bei den weiblichen Mäusen des C3H-Stammes größer als bei den männlichen Mäusen. Bei den JF1-Mäusen fand sich dieser Unterschied nicht.

Soutiere und Mitzner (2004b) haben beschrieben, dass kein Zusammenhang zwischen der Größe des Lungenvolumens und der gemessenen Lcm besteht, die beiden Eigenschaften der Lunge werden unabhängig voneinander vererbt. Das könnte eine Erklärung dafür sein, warum in dieser Arbeit trotz der deutlich größeren Lungenvolumina der männlichen C3H-Mäuse im Vergleich zu den weiblichen kein Unterschied in der Lcm zu finden war.

In der Literatur gibt es nur sehr wenige Vergleichsdaten zu den Geschlechtsunterschieden der beiden in dieser Arbeit gewählten Stämme. Lediglich Reinhardt *et al.* (2005) legten dar, dass sich die Diffusionskapazität zwischen den Geschlechtern bei keinem der beiden Stämme unterscheidet. Daraus ergibt sich kein Ansatz zur Erklärung der hier gefundenen Geschlechtsunterschiede.

Näher untersucht wurden Geschlechtsdimorphismen im Aufbau des Luftraumes allerdings bei anderen Mausstämmen, Nagetieren und auch anderen Säugetieren. Hierbei wurde deutlich, dass weibliche Individuen eine größere Gasaustauschfläche und damit auch bessere Bedingungen für den Gasaustausch haben. Ausgewachsene weibliche Mäuse und Ratten (Massaro G 1995) sowie Rhesusaffen (Hyde DM 2007) hatten mehr und kleinere Alveolen und damit massenspezifisch

eine größere alveoläre Oberfläche als die Männchen der gleichen Spezies. In dieser Arbeit wurde dieselbe Beobachtung gemacht.

Es gibt Hinweise darauf, dass solche Geschlechtsunterschiede ursächlich auf die Wirkung von Geschlechtshormonen auf die Lunge zurückgeführt werden könnten. In einer Studie von Massaro und Massaro (1996) wurde bei weiblichen Ratten im Alter von 21 Tagen eine Ovariectomie durchgeführt. Es zeigte sich, dass diese Ratten im Alter von 59 Tagen eine kleinere alveoläre Gasaustauschfläche und größere Alveolen hatten als Ratten, die zwar operiert wurden, bei denen die Ovariectomie aber nicht durchgeführt wurde. Werden weibliche Ratten mit Östrogenen behandelt, so sind ihre Alveolen kleiner und zahlreicher als bei unbehandelten Tieren (Massaro GD 1996). Bei erwachsenen Mäusen führt die Ovariectomie innerhalb von drei Wochen zum Verlust von Alveolen, Östrogensubstitution wiederum induziert die alveoläre Regeneration und macht den Effekt auf die Architektur rückgängig (Massaro D 2004). Bei Frauen wird dieser Effekt des Östrogenmangels nach der Menopause deutlich. Während bei Männern die Diffusionskapazität mit dem Alter linear abnimmt geschieht dies bei Frauen langsamer und beschleunigt sich erst postmenopausal auf die Geschwindigkeit der Abnahme bei Männern (Neas LM 1996). Durch Hormonsubstitution steigt die Vitalkapazität und das forcierte expiratorische Volumen (FEV1) älterer (Carlson CL 2001) und postmenopausaler Frauen (Pata Ö 2003; Cevrioglu AS 2004).

Weibliche Säugetiere haben somit eine größere Gasaustauschfläche pro kg Körpergewicht als männliche Individuen. Dieser Unterschied wird hormonell beeinflusst. Die größere massenspezifische Gasaustauschfläche dürfte sich aus einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der weiblichen Individuen erklären. Denn wie bereits oben diskutiert, wird das körpertgewichtsspezifische Bedürfnis für Sauerstoff über die Größe der Gasaustauschfläche reguliert (Tenney SM 1963).

Der erhöhte Sauerstoffbedarf weiblicher Säugetiere ergibt sich während Schwangerschaft und Stillzeit. Der Sauerstoffverbrauch ist ein Indikator für die benötigte Energie. Das bedeutet, dass der Sauerstoffverbrauch während einer Schwangerschaft und während der Stillzeit deutlich zunehmen muss, denn in dieser Zeit ist der Energiebedarf weiblicher Individuen erhöht (Gittleman JL 1988; Jasienka G 2003). Massaro *et al.* (1995) zeigten dies für tragende und stillende weibliche Ratten. Ihr Sauerstoffverbrauch war zweimal so hoch wie der weiblicher Ratten desselben Alters, die nicht trächtig waren oder stillten. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die auf ihr Körpergewicht bezogene größere Gasaustauschfläche weiblicher Individuen im Vergleich zu männlichen ein evolutionärer Vorteil ist, der die Reproduktion unterstützt (Massaro D 2006).

Die Mäuse, die in dieser Arbeit sowie auch in den Studien von Reinhard *et al.* (2002; 2005) und Schulz *et al.* (2002) untersucht wurden, haben nie getragen oder gestillt. Trotzdem war ein Unterschied in den strukturellen Parametern zwischen den Geschlechtern vorhanden. In der Schwangerschaft und Stillperiode muss also nur zum Teil oder gar kein zusätzliches Lungengewebe geschaffen werden. Das vorhandene Lungengewebe beinhaltet eine funktionelle Reserve, deren Nutzung optimiert wird. Auch dies spricht für eine evolutionäre Adaption des weiblichen Organismus (Reinhard C 2002).

Während sich dieser Geschlechtsunterschied für die Mäuse des C3H-Stammes sehr deutlich gezeigt hatte, bestand für die JF1-Mäuse lediglich ein Unterschied in der alveolären Oberfläche der freien Septen. Anders als der C3H-Stamm ist der JF1-Stamm ein sehr junger Stamm in der Geschichte der Inzucht von Mäusen. Erst 1993 kam er als Inzucht-Stamm auf den Markt (Koide 2000). In der Literatur finden sich bislang nur sehr wenige Daten, die den Phänotyp der Mäuse beschreiben. Eine gesicherte Aussage, warum die Geschlechtsunterschiede hier so gering ausgeprägt sind, ist also nicht zu treffen.

### 5.3 Die Zusammensetzung des Septums

Bei der Zusammensetzung des Septums hat sich gezeigt, dass die Volumendichten der einzelnen Septumkompartimenten keine stamm- oder geschlechtsspezifischen Unterschiede aufwiesen. Somit wurden die Unterschiede, die bei den Absolutwerten ( $C3H > JF1$ ;  $m > w$ ) sowie den massenspezifischen Volumina ( $C3H < JF1$ ;  $m < w$ ) der Septumkompartimenten auftreten, vor allem durch die Unterschiede im Lungen- und Parenchymvolumen bestimmt. Es bestand also ein allometrischer Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des Septums und dem Lungenvolumen.

Ebenfalls bestimmt wurde die Ratio von Elastin zu Kollagen in den Lungen. Die Elastin/Kollagen-Ratio war bei den männlichen sowie bei den weiblichen C3H-Mäusen kleiner als bei den JF1-Mäusen, das heißt der Elastingehalt bei den Lungen der C3H-Mäuse war im Verhältnis kleiner, bzw. der Kollagengehalt im Verhältnis größer als bei den Lungen der JF1-Mäuse. Die Ratio war bei den Lungen der C3H-Mäusen aber immer noch deutlich  $>1$ , das heißt der Elastingehalt bei den C3H-Mäusen war trotzdem höher als der Kollagengehalt.

Bei der Ratio von Elastin zu Kollagen ergab sich auch ein Geschlechtsunterschied. Allerdings besteht dieser Unterschied nur zwischen den männlichen und weiblichen C3H-Mäusen. Die Ratio bei den männlichen Mäusen war kleiner als bei den weiblichen, aber jeweils  $>1$ .

Bei dem Vergleich der Lungen von zwei Mausstämmen (BALB/c und SAMR1) von Takubo *et al.* (1999) wurde ein Unterschied im Elastingehalt der Lungen deutlich, wobei nach Körpergewichtsnormierung der Elastingehalt der Lungen der größeren Mäuse größer war als der der kleineren Mäuse. Das gleiche Verhältnis ergab sich auch für den Hydroxyprolingehalt, welcher dem Kollagengehalt entspricht (Takubo Y 1999). Der Sachverhalt in der vorliegenden Arbeit war umgekehrt. Die größeren C3H-Mäuse hatten einen kleineren Kollagen- und Elastingehalt als die JF1-Mäuse. In der Ratio Elastin zu Hydroxyprolin zeigte sich bei Takubo *et al.* (1999) aber, dass wie auch in der hier vorliegenden Arbeit mehr Elastin als Kollagen in den Lungen nachzuweisen war.

Sobin *et al.* (1988) untersuchten die Dicke von Elastin und Kollagenfasern in den Alveolarsepten menschlicher Lungen. Die Werte für Elastin waren hierbei höher als die für Kollagen (Sobin SS 1988).

Mercer *et al.* (1994) beschrieben in einem Speziesvergleich, dass das relative Volumen von Elastin und Kollagen im alveolären Endknöpfchen bei Spezies mit größeren Alveolen signifikant höher war als bei Spezies mit kleineren Alveolen. Sie ermittelten für Mäuse (Stamm nicht spezifiziert) sowie für die anderen Spezies, dass der Kollagengehalt der Alveolarsepten stets höher war als der Elastingehalt, also auch die Kollagen/Elastin-Ratio  $>1$  war. Nur im Bereich der Endknöpfchen war die Kollagen/Elastin-Ratio  $\sim 1$  (Mercer RR 1990). Diese Ergebnisse stehen zum Teil im Widerspruch zu denjenigen dieser Arbeit. Zum einen zeigte sich der Unterschied in der relativen Verteilung zwischen dem Stamm mit den größeren Alveolen (C3H) und dem Stamm mit den kleineren Alveolen (JF1) umgekehrt, zum anderen war der ermittelte Elastingehalt bei beiden Stämmen größer als der Kollagengehalt. Eine Erklärung für die Unterschiede im Elastin- und Kollagenvolumen gibt es nicht, allerdings haben Mercer *et al.* (1990) verschiedene Spezies miteinander verglichen, nicht aber Tiere der gleichen Spezies mit unterschiedlichen Alveolargrößen. Eine direkte Vergleichbarkeit liegt somit nicht vor.

Es sind keine Daten bekannt zu Unterschieden von Kollagen und Elastin zwischen den Geschlechtern.

Reinhard *et al.* (2005) beschrieben Unterschiede in der *Compliance* der beiden Mausstämme. Die Lungen der Mäuse des C3H-Stammes sind deutlich dehnbarer als die des JF1-Stammes, die Differenz bleibt auch bei Bestimmung der spezifischen *Compliance* (bezogen auf die TLC) bestehen.

Setnikar hat 1955 die Idee eingeführt, Elastin sei verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Spannung bei niedriger Dehnung, während Kollagen an den Spannungs-Dehnungs-Eigenschaften bei höherer Dehnung mitwirkt (Setnikar I 1955). Nachfolgende Studien stützen diese These. Durch den Einsatz von Kollagenase und Elastase in Hamsterlungen zeigten Karlinsky *et al.* (1976), dass der Verdau von Elastin die Spannungs-Dehnungs-Kurve bei niedriger Dehnung und der Verdau von Kollagen sie bei hoher Dehnung beeinflusst (Karlinsky JB 1976). Yuan *et al.* (1997; 2000) beschrieben ebenfalls, dass Elastin und Kollagen einen Effekt auf die Elastizität der Lunge haben, wobei Kollagen die größere Rolle spielen sollte. Denn nach Auflösung von Kollagen durch Kollagenase kam es zu einer größeren Verschiebung der Stress-Dehnungskurve als nach dem Verdau von Elastin durch Elastase (Yuan H 1997; Yuan H 2000).

Auch bei der Betrachtung der emphysematösen Lunge wird die Rolle von Elastin und Kollagen für die Dehnbarkeit der Lunge deutlich. Beim Emphysem kommt es zu einem erheblichen ultrastrukturellen Umbau des Lungengewebes. Der Elastingehalt ist reduziert (Snider GL 2000; Pastor LM 2006) und der Kollagengehalt erhöht, zusammen mit einer Verdickung der Alveolarsepten (Lang MR 1994; Finlay GA 1996; O'Donnell MD 1999; Toshima M 2004). Berend *et al.* beschrieben 1980, dass in emphysematösen Lungen eine Abnahme der elastischen Eigenschaften zu verzeichnen ist (Berend N 1980). Auch Hartung (1970), Pratt *et al.* (1961) und Ishikawa *et al.* (1967) fanden diesen Zusammenhang bestätigt (Pratt PC 1961; Ishikawa S 1967; Hartung W 1970). In einer Studie von Pare *et al.* (1982) wurden veränderte Druck-Volumen-Eigenschaften beim Emphysem, die auf einen Verlust der Elastizität der Lunge hindeuteten, beschrieben (Pare PD 1982). Die gleichzeitigen Abnahme von Elastin und Kollagen sowie der Verlust der Elastizität der Lunge im Emphysem lassen einen Zusammenhang zwischen der *Compliance* der Lunge und den elastischen und kollagenen Fasern vermuten.

Wie dargestellt, wird die *Compliance* der Lunge von den elastischen und kollagenen Fasern mitbestimmt. Die *Compliance* der Mäuse dieser Stämme wurde im linearen Abschnitt der Druck-Volumen-Kurve bestimmt, die durch die Rückstellung der elastischen Fasern kontrolliert wird (Reinhard C 2002; Reinhard C 2005). Somit sollte sich ein hoher Elastingehalt eher positiv und ein hoher Kollagengehalt eher negativ auf die *Compliance* auswirken.

In dieser Arbeit war dieser Zusammenhang nicht darzustellen. Die Mäuse des C3H-Stammes, deren spezifische *Compliance* fast doppelt so hoch war als die der Mäuse des JF1-Stammes, hatten im Verhältnis zum Elastin einen höheren Kollagengehalt. Zwischen den Geschlechtern der beiden Stämme gab es eine kleinere Elastin/Kollagen-Ratio bei den männlichen C3H-Mäusen im Vergleich zu den weiblichen. Ein Unterschied in der *Compliance* zeigte sich aber für keinen der beiden Stämme.

Die Erklärung dafür kann darin liegen, dass es noch weitere Parameter gibt, die Einflüsse auf die Elastizität und *Compliance* der Lunge ausüben.

Mead hat 1961 festgestellt, dass die elastische Rückstellkraft der Lunge durch die Summe der Spannungen in den Elementen des Bindegewebes, also Elastin und Kollagen, aber auch durch die Oberflächenspannung im peripheren Luftraum bestimmt wird (Mead J 1961). Haber *et al.* (1983) beschrieben darüber hinaus, dass die an der Alveolaroberfläche wirkenden Kräfte die Hauptdeterminanten für die Dehnbarkeit der Lunge sind (Haber PS 1983), wobei die Größe der Alveolen keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung hat (Lum H 1987).

Neben den elastischen und kollagenen Fasern ist also auch das Surfactant, das die Oberflächenspannung herabsetzt, maßgeblich beteiligt an der Determinierung der Elastizität der Lunge. Dies ist wichtig zur Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit. Denn bedenkt man die Unterschiede in der *Compliance* zwischen den beiden Mausstämmen, so können zur Interpretation dieser Unterschiede nicht nur die Volumenanteile an Elastin und Kollagen herangezogen werden, es sollte auch die Verteilung von Surfactant in den beiden Stämmen untersucht werden. Ein Indikator für die Surfactantmenge können die Volumina von Alveolarepithelzellen Typ II sein, die das Surfactant produzieren. Diese Volumina, die mit der Surfactantmenge korrelieren könnten, wurden in dieser Arbeit bestimmt. Es zeigten sich nach Körpergewichtsnormierung stammspezifische Unterschiede sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Mäusen. Die C3H-Mäuse hatten kleinere Gesamtvolumina an Alveolarepithelzellen Typ II, was wiederum auf eine geringere Surfactantmenge und damit auf eine höhere Oberflächenspannung und niedrigere *Compliance* hinweisen könnte, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Doch die reinen Volumina sagen noch nichts über die Aktivität der Alveolarepithelzellen Typ II aus, darum müssten an dieser Stelle noch weitergehende Untersuchungen auf elektronenmikroskopischer und zellphysiologischer Ebene vorgenommen werden.

Neben der Oberflächenspannung gibt es noch weitere Parameter, die, wenn auch indirekt, Einfluss auf die Elastizität der Lunge haben. So muss man bei der

Bestimmung der *Compliance* beachten, dass sie, wird sie wie bei Reinhard *et al.* (2005) am lebendigen Körper und nicht an der dem Körper entnommenen Lunge gemessen, nicht nur durch die elastischen Eigenschaften der Lunge bestimmt wird, sondern auch durch die Steifheit der Brustwand und durch die Stärke der inspiratorischen Muskeln (Mittman C 1965; Hantos Z 1992; Suki B 1995; Hirai T 1999; Ito S 2007). Das bedeutet, dass die bei diesen Mäusen gefundenen Unterschiede in der Lungen*compliance* neben den hier festgestellten in der Ultrastruktur der Lunge auch unterschiedliche Eigenschaften im Körperbau zum Auslöser haben können. Da die beiden Mausstämme sehr unterschiedliche Phänotypen haben und sich auch im Körperbau deutlich unterscheiden (Reed DR 2007), wäre es für die Interpretation der Unterschiede in der Lungen*compliance* hilfreich, weitere Studien anzuschließen, bei denen die *Compliance* an der intra- und extratorakalen Lunge bestimmt und verglichen wird.

## 5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben deutlich gemacht, dass JF1-Mäuse im Vergleich zu C3H-Mäusen eine größere massenspezifische Gasaustauschfläche und eine geringere Dicke der Alveolarsepten und damit vermutlich eine höhere pulmonale Diffusionskapazität haben. Sie kompensieren damit durch niedrige spezifische *Compliance* und hohen Atemwegswiderstand ungünstigere Bedingungen für die Atemarbeit. Zur Untersuchung, ob die größere Gasaustauschfläche und die dünnere Blut-Luft-Schranke bereits bei der Geburt der Mäuse besteht oder ob sie sich postnatal entwickelt, empfiehlt es sich, weitergehende Untersuchungen an Mäusen des JF1-Stammes unterschiedlichen Lebensalters durchzuführen.

Auf ultrastruktureller Ebene haben sich keine Korrelate für die vorher festgestellten Unterschiede in der Atemmechanik gefunden. Der Stammvergleich machte deutlich, dass die Elastin/Kollagen-Ratio der C3H-Mäuse kleiner ist als bei den JF1-Mäusen. Das Verhältnis hätte aber umgekehrt sein müssen, um die niedrigere spezifische *Compliance* und den hohen Atemwegswiderstand der JF1-Mäuse im Vergleich zu den C3H-Mäusen zu erklären. Es empfiehlt sich in nachfolgenden Studien zu überprüfen, ob Unterschiede im Surfactantmetabolismus vorliegen, die einen Einfluss auf die Oberflächenspannung haben. Zudem sollte man der Frage nachgehen, ob bei den phänotypisch sehr divergierenden Stämmen auch Unterschiede in der Steifheit der Brustwand und in der Stärke inspiratorischer



Muskeln vorliegen, die die *Compliance* und den Atemswegswiderstand beeinflussen würden.

Die weiblichen Tiere verfügen über größere Gasaustauschbereiche als die männlichen Tiere. Besonders beim C3H-Stamm wurde dies deutlich, während beim JF1-Stamm die Geschlechtsunterschiede kaum ausgeprägt waren. Ursache dieses größeren Gasaustauschbereiches von Weibchen bezogen auf ihr Körpergewicht ist am ehesten eine evolutionäre Anpassung, die die Reproduktion unterstützt. Während Schwangerschaft und Stillperiode wird vermehrt Energie in Form von Sauerstoff benötigt. Durch die von Geburt an größer angelegte Gasaustauschfläche weiblicher Individuen kann die Nutzung des vorhandenen Lungengewebes als funktionelle Reserve rasch den erhöhten Bedürfnissen angepasst werden. Weiterführend wäre interessant zu untersuchen, in welchem Verhältnis während Schwangerschaft und Stillzeit bestehende Lungengewebe rekrutiert und neue Lungengewebe gebildet werden.

Für das im Literaturvergleich atypisch geringe Körpergewicht der männlichen JF1-Mäuse hat sich keine zufriedenstellende Erklärung gefunden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme stammten aus den gleichen Zuchteinrichtungen wie die Mäuse aus der Mehrheit der einbezogenen Literatur.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch die Darstellung der Ultrastruktur der beiden Mausstämmen zukünftig die Auswahl von Versuchstieren in der pneumologischen Forschung zu erleichtern. Durch die ermittelten phänotypischen Eigenschaften der Stämme kann die Identifizierung von Genfunktionen unterstützt werden.

Die sich verändernden Konzentrationen und Verteilungen von Elastin und Kollagen in der Lunge spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Emphysems. Finden die hier untersuchten Mausstämmen Verwendung in der Emphysemforschung, so können die erfassten Volumina der elastischen und kollagenen Fasern die Erforschung von Pathomechanismen, die dem Emphysem zugrunde liegen, unterstützen.

## 6. Zusammenfassung

Die Maus ist aufgrund ihrer guten Züchtbarkeit und leichten Handhabbarkeit eines der wichtigsten Labortiere in der pneumologischen Forschung. Die Inzuchtstämme bieten als Modellorganismus durch eine geringe genetische Variabilität eine wichtige experimentelle Quelle zur Untersuchung physiologischer, pathophysiologischer und biochemischer Prozesse von Säugetieren (Paigen K 2000). Es besteht die Notwendigkeit, die jeweiligen Phänotypen der zunehmend verwendeten transgenen Tiere und der verschiedenen Mutanten sowie der häufig genutzten Inzucht-Mausstämme zu charakterisieren. Das Wissen über spezifische phänotypische Eigenschaften einzelner Stämme erleichtert die Auswahl von geeigneten Versuchstieren (Reinhard C 2002).

Reinhard *et al.* (2002; 2005) und Schulz *et al.* (2002) zeigten in mehreren Studien, dass zwischen den Mäusen der Inzucht-Stämme C3H/HeJ und JF1/Msf geschlechtsspezifische Unterschiede in Körpergewicht, Lungenvolumen und Funktionsparametern der Lungen bestehen. Zudem wiesen sie nach, dass die C3H-Mäuse das größere Körpergewicht und Lungenvolumen haben und fanden Hinweise darauf, dass JF1-Mäuse bei einer sehr niedrigen *Compliance* bezogen auf das Körpergewicht eine größere alveoläre Diffusionskapazität besitzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob für die festgestellten Unterschiede zwischen Funktionsparametern der Lungen der Inzucht-Stämme C3H und JF1 und zwischen den Geschlechtern der beiden Stämme morphologische Korrelate in der Ultrastruktur zu finden waren. Dazu wurden sowohl die Stämme als auch die Geschlechter miteinander verglichen. Durch die Erhebung von grundlegenden Daten über den Aufbau des Alveolarseptums sollte die Auswahl passender Versuchstiere in der zukünftigen pneumologischen Forschung erleichtert werden.

An Lungen männlicher und weiblicher Mäuse beider Stämme (n=6 pro Gruppe) wurden auf stereologischen Verfahren basierende transmissionselektronen- sowie lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Lungen wurden über die Trachea fixiert. Die Gewebeblöckchen wurden osmiert, mit Tanninsäure und Uranylacetat *en bloc* kontrastiert, in Araldit bzw. Technovit eingebettet und gefärbt. An Richardson gefärbten Schnitten wurden die Volumina von Parenchym, Septen und Luftraum bestimmt. An Orcein gefärbten Schnitten wurde der Luftraum differenziert, die Alveolaroberfläche sowie die *Mean Chord Length* als Indikator für

die Weite von Ductal- und Alveolarraum und die *Mean Face Length* als Indikator für die Anzahl der Alveolen bestimmt. Die Ultrastruktur der Alveolarsepten wurde elektronenmikroskopisch analysiert, die relativen Volumenanteile der Komponenten (Alveolarepithelzellen I und II, Kapillarendothel, Interstitium mit Elastin und Kollagen) quantifiziert und die absoluten Volumina berechnet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben Erklärungen geliefert für die in vorausgegangenen Studien festgestellten stamm- und geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Funktionsparametern der Lungen der beiden untersuchten Mausstämme. Die JF1-Mäuse kompensieren die im Vergleich zu den C3H-Mäusen eher ungünstigen Bedingungen für die Atemarbeit, bedingt durch niedrige spezifische *Compliance* und hohen Atemwegswiderstand, durch eine größere Gasaustauschfläche, eine dünnere Blut-Luft-Schranke und eine höhere pulmonale Diffusionskapazität.

Auf ultrastruktureller Ebene haben sich keine Korrelate für die Unterschiede in der Atemmechanik gefunden. Es besteht ein am ehesten allometrischer Zusammenhang zwischen den Unterschieden in den Lungenvolumina und in den Volumina der Kompartimente des Alveolarseptums. Nur bei den elastischen und kollagenen Fasern zeigte der Stammvergleich, dass die C3H-Mäuse im Verhältnis mehr Kollagen, bzw. weniger Elastin besitzen als die JF1-Mäuse. Zur plausiblen Erklärung der niedrigeren spezifischen *Compliance* und des höheren Atemwegswiderstands der JF1-Mäuse hätte das Verhältnis aber umgekehrt sein müssen.

Die weiblichen Tiere verfügen über einen größeren Gasaustauschbereich als die männlichen Tiere. Besonders im C3H-Stamm wurde dies deutlich, im JF1-Stamm waren die Geschlechtsunterschiede kaum ausgeprägt. Ursächlich für die, bezogen auf ihr Körpergewicht, größere Gasaustauschfläche weiblicher Individuen gegenüber männlichen ist am ehesten ein evolutionärer Vorteil, der die Reproduktion unterstützt. Während Schwangerschaft und Stillperiode wird vermehrt Energie in Form von Sauerstoff benötigt. Ein Unterschied in den strukturellen Parametern ist vorhanden, obwohl die Mäuse dieser Arbeit nie getragen oder gestillt haben. In Schwangerschaft und Stillperiode muss also nicht ausschließlich zusätzliches Lungengewebe geschaffen werden, die Nutzung des vorhandenen Lungengewebes wird auch optimiert.

Eine wichtige Motivation dieser Arbeit war, die Auswahl von Versuchstieren in der pneumologischen Forschung zu erleichtern. Gerade die erfassten Daten über Volumina von Elastin und Kollagen können für die zukünftige Emphysemforschung hilfreich sein, wenn die hier untersuchten Mausstämme dort Verwendung finden.

## 7. Summary

Being easy to breed and to manage, the mouse is one of the most important animals used in pulmonary research. Inbred strains act as model organisms, due to their low genetic variability, an important experimental source to study physiological, pathophysiological and biochemical processes of mammals (Paigen K 2000). It is necessary to characterise the phenotypes of commonly used transgenic animals and mutants as well as the frequently used inbred mouse strains. Knowledge about specific phenotypic properties eases the choice for a suitable laboratory animal (Reinhard C 2002).

In several studies Reinhard *et al.* (2002; 2005) and Schulz *et al.* (2002) showed sex-specific differences in body weight, lung volume and functional parameters of the lung in between the inbred strains C3H/HeJ and JF1/Msf. They also demonstrated that C3H-mice have bigger body weight and lung volume and they found evidence that JF1-mice hold bigger alveolar diffusing capacity while having a smaller compliance related to body weight.

The aim of this work was to examine whether morphologic correlates in the ultrastructure could be found contributing to the differences in functional parameters of the lungs between the inbred strains and the sexes. The two different strains as well as sexes were compared. The selection of appropriate laboratory animals in future pulmonary research should be eased by the collection of data about the composition of the alveolar septum.

Lungs of male and female mice of each strain (n=6 per group) were examined electron- and light-microscopically, based on stereological methods. The lungs were fixed via the trachea. The tissue blocks were osmicated, stained *en bloc* with tannic acid and uranyl acetate, embedded into araldite and Technovit and coloured. Volumes of parenchyma, septums and airspace were identified on Richardson stained slices. Orcein stained slices were used to differentiate the airspace, to identify the alveolar surface area as well as the mean chord length as an indicator for the alveolar size and the mean face length as an indicator for the number of alveoli. The ultrastructure of the alveolar septums was analysed by electron microscopy, volume fractions of the components (alveolar epithel I and II, capillary endothel, interstitium with elastin and collagen) were quantified and the volumes were calculated.

The results of this work gave explanations for strain and sex specific differences in the functional parameters and characteristics shown in prior studies between the

two examined mouse-strains. JF1-mice compensated for the rather disadvantageous conditions for breathing, in comparison to the C3H-mice, caused by low specific compliance and high airway resistance, through a bigger gas exchange region, a thinner blood-gas barrier and a higher pulmonary diffusing capacity.

At ultrastructural level there could not be found correlatives for the differences in the mechanics of breathing. Primarily there is an allometric connection between the differences of the lung volume and the volumes of the alveolar septum compartments. In the comparison of the strains, there is only a difference in the elastic and collagenous fibres, with the C3H-mice showing a proportionally higher amount of collagen and a lower amount of elastin than the JF1-mice. To give a plausible explanation for the lower specific compliance and the higher airway resistance the proportions would have had to be the other way around.

The female animals had a higher gas exchange region than the male animals. This was especially within the C3H-strain, hardly within the JF1-strain. Causal for the bigger gas exchange region of female compared to male individuals when related to the body weight is primarily an evolutionary advantage to support reproduction. During pregnancy and lactation more energy in form of oxygen is needed. There is a difference in the structural parameters, although the mice in this study have never been pregnant or lactating. This means that during pregnancy and lactation not only new lung tissue has to be developed but the utilisation of existing tissue can be optimised.

An important motivation for this work was to ease the choice of laboratory animals in pulmonary research. The data gathered regarding the volumes of elastin and collagen may be especially helpful in the future research of emphysema, if the examined strains are going to be used.

## 8. Literaturverzeichnis

American Thoracic Society (1995). "Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **152**: S77-S121.

Bachmanov AA, R. D., Beauchamp GK, Tordoff MG (2002). "Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preferences of 28 Mouse Strains." Behav Genetics **32**(6): 435-443.

Bachofen H, S. S. (2001). "Alveolar surface forces and lung architecture." Comparative Biochemistry and Physiology Part A **129**: 183-193.

Barnes PJ (2000). "Medical Progress: Chronic obstructive Pulmonary Disease." The New England Journal of Medicine **343**(4): 269-280.

Barnes PJ (2004). "Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Pharmacol Rev **56**: 515-548.

Barry BE, C. J. (1985). "Application of morphometric methods to study diffuse and focal injury in the lung caused by toxic agents." CRC Crit. Rev. Toxicol. **14**: 1-32.

Beck JA, L. S., Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MFW, Fisher EMC (2000). "Genealogies of mouse inbred strains." Nature Genetics **24**: 23-25.

Behan M, T. C. (2005). "Sex Hormone Receptors are expressed in identified respiratory Motoneurons in Male and Female Rats." Neuroscience **130**: 725-734.

Belknap JK, R. J., Cross S, Young ER, Gallaher EJ, Crabbe JC (1998). "Genetic Determinants of Morphine Activity and Thermal Responses in 15 Inbred Mouse Strains." Pharmacol Biochem Behav **59**(2): 353-360.

Berend N, S. C., Thurlbeck WM (1980). "Pressure-volume characteristics of excised human lungs: effects of sex, age and emphysema." J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol **49**(4): 558-565.

Boyce-Rustay JM, J. A., Holmes A (2008). "Effects of chronic swim stress on EtOH-related behaviors in C57BL/6J, DBA/2J and BALB/cByJ mice." Behavioural Brain Research **186**: 133-137.

Brewer JP, K. A., Martin TR (1999). "Genetic Variability in Pulmonary Physiological, Cellular, and Antibody Responses to Antigen in Mice." Am J Respir Crit Care Med **160**: 1150-1156.

Card JW, C. M., Bradbury JA, DeGraff LM, Morgan DL, Moorman MP, Flake GP, Zeldin DC (2006). "Gender Differences in Murine Airway Responsiveness and Lipopolysaccharide-Induced Inflammation." The Journal of Immunology **177**: 621-630.

Card JW, V. J., Ferguson CD, Carey MA, DeGraff LM, Peddada SD, Morgan DL, Zeldin DC (2007). "Male sex hormones promote vagally mediated reflex airway responsiveness to cholinergic stimulation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**: L908-L914.

- Carey MA, C. J., Bradbury A, Moorman MP, Haykal-Coates N, Gavett SH, Graves JP, Walker VR, Flake GP, Voltz JW, Zhu D, Jacobs ER, Dakhama A, Larsen GL, Loader JE, Gelfand EW, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC (2007b). "Spontaneous Airway Hyperresponsiveness in Estrogen Receptor alpha-deficient Mice." Am J Respir Crit Care Med **175**: 126-135.
- Carey MA, C. J., Voltz JW, Arbes Jr SJ, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC (2007a). "It's all about sex: gender, lung development and lung disease." Trends in Endocrinology and Metabolism **18**(8): 308-313.
- Carlson CL, C. M., Enright PL, Cauley JA, Newman AB (2001). "Hormone Replacement Therapy is Associated with Higher FEV1 in Elderly Women." Am J Respir Crit Care Med **163**: 423-428.
- Cevrioglu AS, F. F., Unlu M, Yilmazer M, Orman A, Fenkci IV, Serteser M (2004). "The effects of hormone therapy on pulmonary function in postmenopausal women." Maturitas **49**(3): 221-227.
- Cheek JM, E. M., Crandall ED (1989). "Type I Cell-like Morphology in Tight Alveolar Epithelial Monolayers." Exp Cell Res **184**: 375-387.
- Coultas DB, H. C., Howard CA, Skipper BJ, Samet JM (1991). "Heritability of ventilatory function in smoking and nonsmoking New Mexico Hispanics." Am Rev Respir Dis **144**(4): 770-775.
- Couse JF, L. J., Grandien K, Gustafsson J-A, Korach KS (1997). "Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor alpha (ER- $\alpha$ ) and Estrogen Receptor beta (ER- $\beta$ ) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ERalpha-Knockout Mouse." Endocrinology **138**: 4613-4621.
- Crawley JN, B. J., Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson S C, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R (1997). "Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: Implications and recommendations for molecular studies." Psychopharmacology **132**: 107-124.
- Crouch EC (2000). "Surfactant protein-D and pulmonary host defense." Respir Res **1**: 93-108.
- D'Armiento J, D. S., Okada Y, Berg RA, Chada K (1992). "Collagenase Expression in the Lungs of Transgenic Mice Causes Pulmonary Emphysema." Cell **71**(11): 955-961.
- D'Errico A, S. P., Colosimo E, Spina M, Grigioni WF, Mancini AM (1989). "Changes in the alveolar connective tissue of the ageing lung." Virchows Arch A Pathol Anat **415**: 137-144.
- Dammann CEL, R. S., McCants DD, Pham LD, Nielsen HC (2000). "Androgen Regulation of Signaling Pathways in Late Fetal Mouse Lung Development." Endocrinology **141**: 2923-2929.
- Dodd-o JM, H. M., Welsh-Servinsky LE, Tankersley CG, Pearse DB (2005). "Strain-specific differences in sensitivity to ischemia-reperfusion lung injury in mice." J Appl Physiol **100**: 1590-1595.
- Dunn TB (1954). "The importance of differences in morphology in inbred strains." Jour Nat Cancer Inst **15**: 537-589.

Escolar JD, T. C., Escolar MA, Monalvo F, Garisa R (1997). "Architecture, Elastic Fiber, and Collagen in the Distal Air Portion of the Lung of the 18-Month-Old Rat." The Anatomical Record **248**: 63-69.

Faffe D, R. P., Negri E, Zin W (2002). "Comparison of rat and mouse pulmonary tissue mechanical properties and histology." Journal of Applied Physiology **92**: 230-234.

Fehrenbach H (2001). "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." Respir Res **2**: 33-46.

Fehrenbach H (2007a). "Development of the pulmonary surfactant system." Pneumologie **61**(7): 488-489.

Fehrenbach H, K. M., Tschernig T, Pan T, Schuh D, Shannon JM, Müller M, Mason RJ (1999). "Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells *in vivo* is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis." Eur Respir J **14**: 534-544.

Fehrenbach H, O. M. (1998). Studying lung ultrastructure. Methods in Pulmonary Research. B. Verlag. Basel, Uhlig S, Taylor A.E.

Fehrenbach H, V. R., Michl V, Mehling T, Fehrenbach A, Seeger W, Nyengaard JR (2008). "Neoalveolarisation contributes to compensatory lung growth following pneumonectomy in mice." Eur Respir J **31**(3): 515-522.

Fehrenbach H, Z. G., Starke E, Bratu VA, Conrad D, Yildirim AÖ, Fehrenbach A (2007b). "Nitrogen dioxide induces apoptosis and proliferation but not emphysema in rat lungs." Thorax **62**(438-446).

Festing MFW (1991). "Genetic Quality control of Laboratory Animals Used in Ageing Studies." Neurobiology of Aging **12**: 673-677.

Finlay GA, O. D. M., O'Connor CM, Hayes JP, FitzGerald MX (1996). "Elastin and collagen remodeling in emphysema. A scanning electron microscopy study." Am J Pathol **149**: 1405-1415.

Foronjy RF, D. A. J. (2001). "The role of collagenase in emphysema." Respir Res **2**: 348-352.

Foronjy RF, O. Y., Cole R, D'Armiento JD (2003). "Progressive adult-onset emphysema in transgenic mice expressing human MMP-1 in the lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**: L727-L737.

Ganguly K, S. T., Wesselkamp SC, Reinhard C, Sartor MA, Medvedovic M, Tomlinson CR, Bolle I, Mason JM, Leikauf GD, Schulz H (2007). "Candidate genes controlling pulmonary function in mice: transcript profiling and predicted protein structure." Physiol Genomics **31**: 410-421.

Gehr P, B. M., Weibel E (1978a). "The normal human Lung: Ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity." Respiration Physiology **32**: 121-140.

Gehr P, H. C., Burri PH, Bachofen H, Weibel ER (1978b). "Adaptation of the growing lung to increased VO<sub>2</sub>: III. The effect of exposure to cold environment in Rats." Respiration Physiology **32**: 345-353.



Giannopoulos G, S. S. S. (1982). "Androgen Receptors in fetal Rabbit lung and the effect of fetal sex on the levels of circulating hormones and pulmonary hormone receptors." J steroid Biochem **17**: 461-465.

Gittleman JL, T. S. (1988). "Energy Allocation in Mammalian Reproduction." Amer Zool **28**(863-875).

Glatt V, C. E., Stadmeier L, Bouxsein ML (2007). "Age-Related Changes in Trabecular Architecture Differ in Female and Male C57BL/6J Mice." Jornal of Bone and Mineral Research **22**(8): 1197-1207.

González-Arenas A, N.-G. T., Guerra-Araiza C, Camcho-Arroyo I (2004). "Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats." Steroids **69**: 351-356.

Guénet JL, B. F. (2003). "Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model." Trends in Genetics **19**(1): 24-31.

Haber PS, C. H., Ng CKY, Greaves IA (1983). "Alveolar size as a determinant of pulmonary distensibility in mammalian lungs." J Appl Physiol **54**(3): 837-45.

Haidar A, R. T., Mobberley MA, Wigglesworth JS (1992). "Two techniques for electron opaque staining of elastic fibres using tannic acid in fresh and formalin fixed tissue." J Clin Pathol **45**(7): 633-635.

Hantos Z, A. A., Govaerts E, Daróczy B (1992). "Mechanical impedances of lungs and chest wall in the cat." J Appl Physiol **73**(2): 427-433.

Hartung W (1970). "Mechanical properties of excised human emphysematous lungs: methods of measurement, results and conclusions." Pathol Microbiol (Basel) **335**: 146-156.

Held HD, U. S. (2000). "Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains." Journal of Applied Physiology **88**: 2192-2198.

Heldring N, P. A., Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson J-A (2007). "Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets." Physiol Rev **87**: 905-931.

Henson PM, V. R., Douglas IS (2006). "Cell Death, Remodeling, and Repair in Chronic Obstructive Pulmonary Disease?" Proc Am Thorac Soc **3**: 713-717.

Hirai T, M. K., Gomes RFM, Bates JHT (1999). "Effects of lung volume on lung and chest wall mechanics in rats." J Appl Physiol **86**(1): 16-21.

Hogg JC, S. R. (2002). "Chronic obstructive pulmonary disease c2: Pathology and biochemistry of emphysema." Thorax **57**: 830-834.

Howard CV, R. M. (1998). Unbiased Stereology - Three-dimensional Measurement in Microscopy, BIOS Scientific Publisher.

Hyde DM, B. S., Avdalovic MV, Putney LF, Dettorre R, Quesenberry NJ, Singh P, Tyler NK (2007). "Alveoli increase in number but not size from birth to adulthood in rhesus monkeys." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**: L570-L579.

- Ikegami M (2006). "Surfactant catabolism." Respirology **11**: S24-S27.
- Ingram DK, J. M. (1999). "Developing mouse models of aging: a consideration of strain differences in age-related behavioral and neural parameters." Neurobiology of Aging **20**: 137-145.
- Ishikawa S, F. G., Zylak C, Cherniak RM, Wyatt JP (1967). "A postmortem study of viscoelastic properties of lung in emphysema (correlation with quantitative morphometry)." Aspen Emphysema Conf **10**: 325-337.
- Ito S, I. E., Brewer KK, Black LD, Parameswaran H, Lutchen KR, Suki B (2005). "Mechanics, nonlinearity and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling." J Appl Physiol **98**: 503-511.
- Ito S, L. K., Suki B (2007). "Effects of heterogeneities on the partitioning of airway and tissue properties in normal mice." J Appl Physiol **102**: 859-869.
- Jasienka G (2003). "Energy metabolism and the evolution of reproductive suppression in the human female." Acta Biotheoretica **51**: 1-18.
- Kanazawa H (2007). "Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease." Med Sci Monit **13**(11): RA189-195.
- Karlinsky JB, S. G., Franzblau C, Stone PJ, Hoppin Jr. FG (1976). "In vitro effects of elastase and collagenase on mechanical properties of hamster lungs." Am Rev Respir Dis **113**: 769-777.
- Kest B, W. S., Mogil JS (1999). "Sex Differences in Supraspinal Morphine Analgesia Are Dependent on Genotype." Pharmacology and Experimental Therapeutics **289**(3): 1370-1375.
- Kida K, F. Y., Thurlbeck WM (1989). "A Comparison of Lung Structure in Male DBA and C57 Black Mice and Their F1 Offspring." Am Rev Respir Dis **139**(5): 1238-1243.
- Kimura Y, S. T., Kaneko C, Darnel AD, Akahira J, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H (2003). "Expression of androgen receptor and 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: a possible correlation with branching morphogenesis." Clinical Science **105**: 709-713.
- Kleeberger SR, R. S., Zhang LY, Jedlicka AE (2000). "Genetic Susceptibility to Ozone-Induced Lung Hyperpermeability - Role of Toll-Like Receptor 4." Am J Respir Cell Mol Biol **22**: 620-627.
- Koczulla AR, V. C. (2008). "Chronic obstructive pulmonary disease: from pathogenesis to treatment." Dtsch Med Wochenschr **133**(10): 471-475.
- Koide T, M. K., Ikeda K, Niki H, Shiroishi T (2000). "Multi-phenotype behavioral characterization of inbred strains derived from wild stocks of *Mus musculus*." Mammalian Genome **11**: 664-670.
- Koide T, M. K., Uchida K, Mita A, Sagai T, Yonekawa H, Katoh H, Miyashita N, Tsuchiya K, Nielsen TJ, Shiroishi T (1998). "A new inbred strain JF1 established from Japanese fancy mouse carrying the classic piebald allele." Mammalian Genome **9**: 15-19.

Kononov S, B. K., Sakai H, Cavalcante FSA, Sabayanagam CR, Ingenito EP, Suki B (2001). "Roles of Mechanical Forces and Collagen Failure in the Development of Elastase-induced Emphysema." Am J Respir Crit Care Med **164**: 1920-1926.

Ladekarl M (1994). "The influence of tissue processing on quantitative histopathology in breast cancer." J Microsc **174**(2): 93-100.

Lai YL, C. H. (2000). "Respiratory mechanics and maximal expiratory flow in the anesthetized mouse." J Appl Physiol **88**: 939-943.

Lang MR, F. G., Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D (1994). "Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs." Thorax **49**: 319-326.

Li R, S. K., Donahue LRB, Peters LL, Churchill GA (2008). "The Relationship of Dietary Fat, Body Composition and Bone Mineral Density in Inbred Mouse Strain Panels." Physiol Genomics **33**(1): 26-32.

Lightfoot JT, T. M., Debate KA, Kleeberger SR (2001). "Interstrain variation in murine aerobic capacity." Med Sci. Sports Exerc. **33**(12): 2053-2057.

Linder CC (2006). "Genetic Variables that influence Phenotype." ILAR J **47**(2): 132-140.

Lum H, M. W. (1987). "A species comparison of alveolar size and surface forces." J Appl Physiol **62**(5): 1865-1871.

Massaro D, C. L., DeCarlo Massaro G (2007). "Estrogen receptor- $\alpha$  regulates pulmonary alveolar loss and regeneration in female mice: morphometric and gene expression studies." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**: L222-L228.

Massaro D, D. M. G. (2004). "Estrogen regulates pulmonary alveolar formation, loss, and regeneration in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**: L1154-L1159.

Massaro D, D. M. G. (2006). "Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimension: Alveolar sexual dimorphism in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**: L866-L870.

Massaro G, M. J., Massaro D (1995). "Sexual dimorphism in the architecture of the lung's gas-exchange region." Proc. Natl. Acad. Sci USA **92**: 1105-1107.

Massaro GD, M. J., Massaro D (1996). "Estrogen modulates the dimensions of the lung's gas-exchange surface areal and alveoli in female rats." Am J Physiol **270**(1): L110-L114.

Mead J (1961). "Mechanical properties of lungs." Physiol Rev **41**: 281-330.

Mendelson CR, M. P., Johnston JM (1980). "Estrogen binding in human fetal lung tissue cytosol." Endocrinology **106**: 368-374.

Mercer RR, C. J. (1990). "Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs." J Appl Physiol **69**(2): 756-765.

Mercer RR, L. J., Crapo JD (1987). "Three-dimensional reconstruction of alveoli in the rat lung for pressure-volume relationship." J Appl Physiol **62**(4): 1480-1487.

- Mercer RR, R. M., Crapo J (1994). "Alveolar septal structure in different species." J Appl Physiol **77**(3): 1060-1066.
- Mittman C, E. N., Norris AH, Shock NW (1965). "Relationship between chest wall and pulmonary compliance and age." J Appl Physiol **20**: 1211-1216.
- Mogil JS, W. S., Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M (1999). "Heritability of nociception I: Responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception." Pain **80**: 67-82.
- Mollerup S, J. K., Berge G, Haugen A (2002). "Expression of estrogen receptors- $\alpha$  and - $\beta$  in human lung tissue and cell lines." Lung Cancer **37**: 153-159.
- Morani A, B. R., Imamov O, Hultenby K, Arner A, Warner M, Gustafsson J-A (2006). "Lung dysfunction causes systemic hypoxia in estrogen receptor- $\beta$  knockout (ER- $\beta$ -/-) mice." PNAS **103**(18): 7165-7169.
- Moriwaki K, S. T., Yonekawa H (1994). Genetics in Wild Mice. Its Application to Biomedical Research. Tokyo, Japan Scientific Societies Press/Karger.
- Mortola JP, S. C. (1996). "Ventilatory response to hypoxia in rats: gender differences." Respiration Physiology **106**: 21-34.
- Moser EH, D. G. (1982). "Detection of a heat- and acid-stable 'progesterone'-binding protein in the rat lung." FEBS Letters **150**(2): 347-353.
- Neas LM, S. J. (1996). "The determinants of pulmonary diffusing capacity in a national sample of U.S. adults." Am J Respir Crit Care Med **153**(2): 656-664.
- Nielsen HC (1985). "Androgen Receptors Influence the Production of Pulmonary Surfactant in the Testicular Feminization Mouse Fetus." J Clin Invest **76**: 177-181.
- Nielsen HC, H. H., Torday JS (1982). "Dihydrotestosterone Inhibits Fetal Rabbit Pulmonary Surfactant Production." J Clin Invest **69**: 611-616.
- Nielsen HC, T. J. (1981). "Sex differences in fetal rabbit pulmonary surfactant production." Pediatric Research **15**(9): 1245-1247.
- Noonan FP, H. H. (1994). "Susceptibility to immunosuppression by ultraviolet B radiation in the mouse." Immunogenetics **39**: 29-39.
- O'Donnell MD, O. C. C., FitzGerald MX, Lungarella G, Cavarra E, Martorana P (1999). "Ultrastructure of lung elastin and collagen in mouse models of spontaneous emphysema." Matrix Biology **18**: 357-360.
- Ochs M (2006). "A brief update on lung stereology." Journal of Microscopy **222**(3): 188-200.
- Ohtsuka Y, B. K., Jedlicka AE, Mitzner W, Clarke RW, Zhang L-Y, Eleff SM, Kleeberger SR (2000). "Genetic Linkage Analysis of Susceptibility to Particle Exposure in Mice." Am J Respir Cell Mol Biol **22**: 574-581.
- Oldmixon E, B. J., Hoppin F (1989a). "Lengths and topology of alveolar septal borders." J Appl Physiol **67**(5): 1930-1940.

- Oldmixon E, H. F. (1989b). "Distribution of elastin and collagen in canine lung alveolar parenchyma." J Appl Physiol **67**(5): 1941-1949.
- Osmanliev DP, J. H., Watson RA, Pride NB (2005). "Evolution of changes in carbon monoxide transfer factor in men with chronic obstructive pulmonary disease." Respiratory Medicine **99**: 1053-1060.
- Paigen K, E. J. (2000). "A mouse phenome project." Mammalian Genome **11**(9): 715-717.
- Pare PD, B. L., Bates J, Lawson LM, Nelems JMB, Wright JL, Hogg JC (1982). "Exponential Analysis of the Lung Pressure-Volume Curve as a Predictor of Pulmonary Emphysema." Am Rev Respir Dis **126**: 54-61.
- Park JW, R. S., Choi AMK (2007). "Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease." COPD **4**(4): 347-353.
- Pastor LM, S.-G. F., Girona JC, Bernal-Manas CM, Morales E, Beltrán-Frutos E, Canteras M (2006). "Morphogenesis of rat experimental pulmonary emphysema induced by intratracheally administered papain: changes in elastic fibres." Histol Histopathol **21**: 1309-1319.
- Pata Ö, A. S., Öz AU, Yazici G, Tok E, Pata C, Kilic F, Camdeviren H, Aban M (2003). "The effects of hormonal replacement therapy on pulmonary functions in postmenopausal women." Maturitas **46**(3): 213-218.
- Patrone C, C. T., Pettersson K, Piao Y-S, Cheng G, Ciana P, Maggi A, Warner M, Gustafsson J-A, Nord M (2003). "Regulation of Postnatal Lung Development and Homeostasis by Estrogen Receptor- $\beta$ ." Molecular and Cellular Biology **23**(23): 8542-8552.
- Powell FL, H. S. (2004). "Comparative Physiology of Lung Complexity: Implications for Gas Exchange." News Physiol Sci **19**: 55-60.
- Pratt PC, H. A., Klugh GA (1961). "Correlation of postmortem function and structure in normal and emphysematous lungs." Am Rev Respir Dis **83**: 856-865.
- Reed DR, B. A., Tordoff MG (2007). "Forty mouse strains survey of body composition." Physiol Behav **91**: 593-600.
- Reinhard C, E. G., Fuchs H, Zeisenis A, Heyder J, Schulz H (2002). "Inbred strain variation in lung function." Mammalian Genome **13**: 429-437.
- Reinhard C, M. B., Fuchs H, Stoeger T, Eder G, Rüschemdorf F, Heyder J, Nürnberg P, Hrabé de Angelis M, Schulz H (2005). "Genomewide Linkage Analysis Identifies Novel Genetic Loci for Lung Funktion in Mice." Journal Respir Crit Care Med **171**: 880-888.
- Rohan RM, F. A., Udagawa T, Yuan J, D'Amato RJ (2000). "Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice." FASEB J **14**: 871-876.
- Romanoski J, D. G. (2002). "Test scores, measurement, and the use of analysis of variance: an historical overview." J Appl Meas **3**(3): 232-242.

- Rosenblum Lichtenstein JH, M. R. M., Donghey TC, Brain JD (2006). "Strain Differences Influence Murine Pulmonary Responses to *Stachybotrys chartarum*." Am J Respir Cell Mol Biol **35**: 415-423.
- Rosenquist TH (1981). "Organization of Collagen in the Human Pulmonary Alveolar Wall." The Anatomical Record **200**: 447-459.
- Ryan US (1984). "Isolation and Culture of Pulmonary Endothelial Cells." Environ Health Perspect **56**: 103-114.
- Sakai T, K. Y., Miura I, Inoue T, Moriwaki K, Shiroishi T, Satta Y, Takahata N, Yonekawa H (2005). "Origins of mouse inbred strains deduced from whole-genome scanning by polymorphic microsatellite loci." Mammalian Genome **16**: 11-19.
- Sato A, H. Y., Hara T, Muro S, Nakamura H, Mishima M, Yodoi J (2008). "Thioredoxin-1 ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice." J Pharmacol Exp Ther **11**: Epub ahead of print.
- Scherle W (1970). "A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology." Mikroskopie **26**(1): 57-60.
- Schulte-Herbrüggen O, K. J., Quarcio D, Meisel C, Meisel A (2006). "Mouse strains Differ in Their Susceptibility to Poststroke Infections." Neuroimmunomodulation **13**: 13-18.
- Schulz H, J. C., Eder G, Ziesenis A, Reitmeier P, Heyder J, Balling R (2002). "Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences." Acta Physiologica Scandinavica **174**: 367-375.
- Schürch S, G. F., Bachofen H (1998). "Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry." Biochemica et Biophysica Acta **1408**: 180-202.
- Setnikar I (1955). "Origin and significance of the mechanical property of the lung." Arch Fisiol **55**(4): 349-374.
- Shapiro SD (2000). "Vascular atrophy and VEGFR-2 signaling: old theories of pulmonary emphysema meet new data." The Journal of Clinical Investigation **106**(11): 1309-1310.
- Shi W, B. S., Warburton D (2007). "Lung Development and Adult Diseases." Chest **132**: 651-656.
- Shifren A, D. A., Knutsen RH, Hirano E, Mecham RP (2007). "Elastin protein levels are a vital modifier affecting normal lung development and susceptibility to emphysema." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**: L778-L787.
- Shifren A, M. R. (2006). "The Stumbling Block in Lung Repair of Emphysema: Elastic Fiber Assembly." Proc Am Thorac Soc **3**: 428-433.
- Shinagawa K, K. M. (2003). "Mouse Model of Airway Remodeling, Strain differences." Respir Crit Care Med **168**: 959-976.
- Siafakas NM, A. K., Tzortzaki EG (2007). "Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease." In J Chron Obstruct Pulmon Dis **2**(4): 453-462.

- Silver LE (1995). Mouse genetics: Concepts and Applications. New York.
- Singh B, S. K., Taube C, Gelfand EW, Pabst R (2005). "Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation." Clinical and Experimental Immunology **141**: 223-229.
- Snider GL (2000). "Clinical Relevance Summary: Collagen vs Elastin in Pathogenesis of Emphysema; Cellular Origin of Elastases; Bronchiolitis vs Emphysema as a Cause of Airflow Obstruction." Chest **117**: 244-246.
- Sobin SS, F. Y., Tremmer HM (1988). "Collagen and elastin fibers in human pulmonary alveolar walls." J Appl Physiol **64**: 1659-1675.
- Sorokin S (1966). Histology. G. RO. New York, McGraw-Hill Book Co.
- Soutiere S, M. W. (2004a). "On defining total lung capacity in the mouse." J Appl Physiol **96**: 1658-1664.
- Soutiere S, M. W. (2006). "Comparison of postnatal lung growth and development between C3H/HeJ and C57BL/6J mice." J Appl Physiol **100**: 1577-1583.
- Soutiere S, T. C., Mitzner W (2004b). "Differences in alveolar size in inbred mouse strains." Respiratory Physiology and Neurobiology **140**(3): 283-291.
- Starcher B C (2000). "Lung Elastin and Matrix." Chest **117**: 229-234.
- Suki B, I. S., Stamenovic D, Lutchen K R, Ingenito E P (2005). "Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces." J Appl Physiol **98**: 1892-1899.
- Suki B, L. K., Ingenito EP (2003). "On the Progressive Nature of Emphysema." Am J Respir Crit Care Med **168**: 516-521.
- Suki B, P. F., Adamicza A, Hantos Z, Lutchen KR (1995). "Partitioning of airway and lung tissue properties: comparison of in situ and open-chest conditions." J Appl Physiol **79**(3): 861-869.
- Suzuki M, B. T., Nagai K, Fuke S, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nishimura M (2008). "Decreased Airway Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Cigarette Smoke-induced Emphysema in Mice and COPD Patients." Inhalation Toxicology **20**(3): 349-359.
- Takubo Y, G. A., Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JHT, Hoidal JR, Cosio MG (2002). " $\alpha$ -1-Antitrypsin Determines the Pattern of Emphysema and Function in Tobacco Smoke-exposed Mice." Am J Respir Crit Care Med **166**: 1596-1603.
- Takubo Y, H. T., Muro S, Kogishi K, Hosokawa M, Mishima M (1999). "Age-associated changes in elastin and collagen content and the proportion of types I and III collagen in the lung of mice." Experimental Gerontology **34**: 353-364.
- Tanaka R, A.-J. R., Ludwig MS (2001). "Maturation changes in extracellular matrix and lung tissue mechanics." J Appl Physiol **91**: 2314-2321.
- Tanaka R, L. M. (1999). "Changes in viscoelastic properties of rat lung parenchymal strips with maturation." J Appl Physiol **87**(2081-2089).

Tankersley C, R. R., Mitzner W (1999a). "Differential lung mechanics are genetically determined in inbred murine strains." J Appl Physiol **86**(6): 1764-1769.

Tankersley CG (1999b). "Genetic control of ventilation: What are we learning from murine models?" Curr Opin Pulm Med **5**(6): 344-354.

Tankersley CG, D. D., Jedlicka AE, Wilkins HM, Zhang L (1998). "Differential inspiratory timing is genetically linked to mouse chromosome 3." J Appl Physiol **85**(1): 360-365.

Tankersley CG, F. R., Kleeberger SR (1994). "Differential control of ventilation among inbred strains of mice." Am J Physiol **267**: R1371-R1377.

Tankersley CG, F. R., Levitt RC, Mitzner WA, Ewart SL, Kleeberger SR (1997). "Genetic control of differential baseline breathing pattern." J Appl Physiol **82**(3): 874-881.

Taraseviciene-Stewart L, D. I., Nana-Sinkam PS, Lee JD, Tudor RM, Nicolls MR, Voelkel NF (2006). "Is Alveolar Destruction and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease an Immune Disease?" Proc Am Thorac Soc **3**: 687-690.

Tenney SM, R. J. (1963). "Comparative Quantitative Morphology of the Mammalian Lung: Diffusing Area." Nature **197**: 54-56.

Thurlbeck WM (1975). "Lung growth and alveolar multiplication." Pathobiol Annu **5**: 1-34.

Torday JS, D. K. (1984). "Synergistic effect of triiodothyronine and dexamethasone on male and female fetal rat lung surfactant synthesis." Dev Pharmacol Ther **7**(2): 133-139.

Torday JS, N. H., Fencel M, Avery ME (1981). "Sex differences in fetal lung maturation." Am Rev Respir Dis **123**(2): 205-208.

Toshima M, O. Y., Ohtani O (2004). "Three-dimensional architecture of elastin and collagen fiber networks in the human and rat lung." Arch Histol Cytol **67**(1): 31-40.

Vaccaro C, B. J. (1978). "Ultrastructure of Developing Alveoli." Anat Rec **192**: 467-480.

Valenca SS, d. H. K., Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC (2004). "Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke." Toxicol Pathol **32**(3): 351-356.

Veldhuizen R, P. F. (2004). "Phospholipid metabolism in lung surfactant." Subcell Biochem **37**: 359-388.

Verbeken, E., Cauberghs M, Mertens I, Clement J, Lauweryns J, Van de Woestijne K (1992). "The Senile Lung Comparison with Normal and Emphysematous Lungs." Chest **101**(6): 800-809.

Vlahovic G, R. M., Mercer RR, Crapo JD (1999). "Cellular and Connective Tissue Changes in Alveolar Septal Walls in Emphysema." Am J Respir Crit Care Med **160**: 2086-2092.



- Walther FJ, W. A., Sherman MA, Zasadzinski JA, Gordon LM (2007). "Hydrophobic Surfactant Proteins and Their Analogues." Neonatology **91**: 303-310.
- Warburton D, G. J., Bellusci S, Shi W (2006). "Lung Development and Susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Proc Am Thorac Soc **3**: 668-672.
- Wasowicz M, B. W., Marszalek A, Yokoyama S, Nakayama I (1998). "Ultrastructural studies on selected elements of the extracellular matrix in the developing rat lung alveolus." Folia Histochem Cytobiol **36**(1): 3-13.
- Weibel ER (1984a). Lung cell biology. The pathway for oxygen. Cambridge Mass.: 232-269.
- Weibel ER (1984b). The Lungs's mechanical support. The pathway for oxygen. Cambridge Mass: 302-338.
- Weibel ER (2008). "How to make an alveolus." Eur Respir J **31**(3): 483-485.
- Weibel ER, G. J. (1968). "Electron microscopic demonstration of an extracellular duplex lining layer of Alveoli." Resp Phys **4**: 42-57.
- Wells JCK (2007). "Sexual dimorphism of body composition." Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism **21**(3): 415-430.
- Wilborn WH (1968). "Hormonal Effects on Oxygen consumption and histology of submandibular glands of mice (mus musculus)." Comp Biochem Physiol **27**: 357-363.
- Wood AM, S. R. (2006). "The genetics of chronic obstructive pulmonary disease." Respiratory Research **7**: 130-144.
- Wood J, K. J., McBride J (1998). "Changes in alveolar septal border lengths with postnatal lung growth." Am J Physiol **275**(Lung Cell Mol Physiol 19): 1157-1163.
- Worth H, B. R., Cegla U, Criege CP, Gillissen A, Kardos P, Kohler D, Magnussen H, Meister R, Nowak D, Petro W, Rabe KF, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R (2002). "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive bronchitis and pulmonary emphysema issued by Deutsche Gesellschaft für Pneumologie (in Germany)." Pneumologie **56**: 704-738.
- Yoshiki A, M. K. (2006). "Mouse Phenome Research: Implications of Genetic Background." ILAR J **47**(2): 94-102.
- Yuan H, I. E. P., Suki B (1997). "Dynamic properties of lung parenchyma: mechanical contributions of fiber network and interstitial cells." J Appl Physiol **83**(5): 1420-1431.
- Yuan H, K. S., Cavalcante FSA, Lutchen KR, Ingenito EP, Suki B (2000). "Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips." J Appl Physiol **89**: 3-14.
- Zheng QY, J. K., Erway LC (1999). "Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses." Hearing Research **130**: 94-107.

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren:

Arnold, Barth, Basler, Baum, Becker, Czubayko, Dünne, Eilers, Feuser, Geus, Christiansen, Gerdes, Gotzen, Griss, Gudermann, Hamer, Happle, Hertl, Hörle, Jungclas, Kann, Klenk, König, Koolman, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Moll, Müller, Mutters, Oertel, Printz, Remschmidt, Renz, Schmidt, Schrader, Seitz, Stiletto, Studer, Weihe, Werner, Wulf.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und seine Betreuung, Unterstützung und Hilfe in allen Phasen der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der klinischen Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“, darunter besonders Frau Roswitha Naumann und Frau Tanja Rausch für die Einarbeitung in die Methoden, die stete Hilfe und die freundliche und freundschaftliche Aufnahme im Labor.

Herrn Dr. Shinji Takenaka für die Unterstützung in der Präparation der Mäuse und Herrn Vlad Bratu für die Hilfe bei der Ermittlung der *Mean Chord Length*.

Frau Dr. Julia Grabitzki und Herrn Martin Hühn für das Lektorat des Manuskripts.

Meinen Tischnachbarn in der Bibliothek, Dorle und Sandra. Ohne Euch wäre ich sicherlich nicht lange genug sitzen geblieben, um diese Arbeit tatsächlich fertigzustellen.

Meinen Eltern und meiner Familie für die beständige Unterstützung – während dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums.

Pablo, für die Kraft, Geduld und Liebe.